

ISSN 0015-3303

Том 70, Номер 7

Декабрь 2023



ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



Вторичные метаболиты
растительных организмов

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 70, номер 7, 2023

Спецвыпуск “Вторичные метаболиты растительных организмов”

Приглашенные редакторы А.М. Носов, Е.В. Попова

ОБЗОРЫ

- Антоцианы растений: структура, регуляция биосинтеза, функции, экология
Т. К. Головки 701
- Фуранокумарины зонтичных: история исследования, разнообразие, генетические основы синтеза, физиологическая роль в растении и применение в медицине
В. Ю. Штратникова 715

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Фенологические вариации вторичных метаболитов *Dracosephalum charkeviczii*
В. П. Григорчук, О. В. Наконечная, О. В. Грищенко, А. Б. Безделев 736
- Получение длительно культивируемой эмбрионной культуры *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut. и ее цитологическое и биохимическое исследование
Н. И. Румянцева, Ю. А. Костюкова, А. И. Валиева, А. Н. Акулов, М. В. Агеева 743
- Изменчивость состава биологически активных веществ в цветках и листьях *Achillea asiatica* Serg. в зависимости от региона произрастания
В. П. Курченко, Н. В. Сушинская, Е. В. Чудновская, Е. И. Тарун, П. С. Шабуня, А. Д. Лодыгин, И. А. Хрусталева, А. Н. Курпиров 758
- Фенольные соединения растений *Bidens tripartita* (L.) и *Bidens pilosa* (L.) из разных мест обитания
Э. Бименьиндавы, Л. З. Хуснетдинова, О. А. Тимофеева 765
- Содержание генциопикрозида в природных популяциях *Gentiana cruciata* L., произрастающих на территории Республики Татарстан
Л. З. Хуснетдинова, А. Н. Акулов, С. А. Дубровная, О. А. Тимофеева, Р. М. Мухаметшина 774
- Определение комплекса полифенольных соединений в ягодах камчатской жимолости *Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest
М. П. Разгонова, Е. Н. Петруша, Е. А. Русакова, К. С. Голохваст 782
- Флавоноидные гликозиды в листьях растений рода *Nigella* L.
С. Н. Шиш, П. С. Шабуня, С. А. Фатыхова, В. Н. Решетников, Е. В. Спиридович 790
- Влияние аномальных свето-темновых циклов на пигментный комплекс растений семейств Brassicaceae и Solanaceae
Т. Г. Шибаева, Е. Г. Шерудило, А. А. Рубаева, И. А. Лёвкин, А. Ф. Титов 801
- Влияние регуляторов роста и различных спектров монохроматического излучения на ростовые и биосинтетические характеристики каллусной культуры *Ipomoea batatas* (L.) Lam.
Ю. А. Югай, О. В. Грищенко, Е. А. Васюткина, В. П. Григорчук, Е. Н. Чухломина, Ж. Л. Цыденешиева, О. Д. Кудинова, Ю. Л. Ярошенко, А. И. Дегтяренко, Е. П. Субботин, В. П. Булгаков, Ю. Н. Кульчин, Ю. Н. Шкрыль 811
- Хромато-масс-спектрометрический анализ гинзенозидов в морфогенных клеточных линиях женьшеня настоящего (*Panax ginseng* C.A. Meyer)
Т. Ю. Горпенченко, В. П. Григорчук, В. В. Маханьков, Д. В. Кочкин, Ю. В. Воложжанина, М. Т. Ханды, Г. К. Чернопед, Ю. Н. Журавлев 823

Редкое растение Центральной Якутии <i>Polygala sibirica</i> L.: фитохимический профиль и получение морфогенной культуры <i>in vitro</i> Ж. М. Охлопкова, М. П. Разгонова, Е. В. Кучарова, П. С. Егорова, К. С. Голохваст	836
Управление биосинтетическим потенциалом асептических растений и каллусных культур <i>Ocimum basilicum</i> L. <i>in vitro</i> М. Ю. Чередниченко, О. Б. Поливанова, Д. А. Хлебникова, О. Ю. Словарева, Р. Н. Киракосян, Е. А. Калашикова	846
Накопление полифенолов и нафтохинонов в морфогенных культурах двух видов рода <i>Drosera</i> А. В. Моршнева, М. Т. Ханды, В. П. Григорчук, Г. К. Чернодод, Т. Ю. Горпенченко	858
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi: проекция метаболома корня в культуре корневых волосков Ю. Н. Елькин, А. Ю. Маняхин, А. Ю. Степанова	866
Роль некоторых флавоноидов и олеуропеина в формировании морозостойкости <i>Olea europaea</i> L. А. Е. Палий, Т. Б. Губанова	875
Стериновый состав лишайника <i>Peltigera canina</i> при действии неблагоприятных температур Ю. Н. Валитова, В. Р. Хабибрахманова, В. М. Бабаев, В. Л. Уваева, А. Ф. Хайруллина, Д. Ф. Рахматуллина, Е. И. Галеева, М. А. Свид, Ф. В. Минибаева	887
Изменения содержания каротиноидов в побегах мха <i>Hylocomium splendens</i> Hedw. в условиях температурного стресса А. Г. Ренкова, В. Р. Хабибрахманова, О. П. Гурьянов, Е. И. Галеева, А. Б. Мазина, Ф. В. Минибаева	898
Эколого-физиологические характеристики и биотехнологический потенциал диатомовой водоросли <i>Nitzschia atabilis</i> H. Suzuki С. Л. Полякова, С. Н. Железнова, Р. Г. Геворгиз, Н. А. Давидович	906
Анализ провоспалительных свойств растительных оксипиринов, образующихся в гидропероксидлиазной ветви Я. В. Радзюкевич, К. Г. Тихонов, Е. А. Дегтярёв, В. И. Дегтярёва, Т. В. Савченко	915
Применение <i>in silico</i> анализа для определения морфогенеза в культуре растительной ткани К. В. Малахова, Д. Н. Зонтиков, А. И. Щербакова, Р. В. Сергеев	923

УДК 581.1

АНТОЦИАНЫ РАСТЕНИЙ: СТРУКТУРА, РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА, ФУНКЦИИ, ЭКОЛОГИЯ

© 2023 г. Т. К. Головки*

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: govlovkco@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 09.08.2023 г.

После доработки 12.09.2023 г.

Принята к публикации 14.09.2023 г.

В обзоре представлены современные сведения об антоцианах (АЦ), их локализации в различных органах и тканях растений. Рассмотрены пути и регуляция биосинтеза, функциональная значимость и экологическая роль этих соединений в жизнедеятельности и адаптации к условиям среды. Обобщены данные об индукции синтеза АЦ под влиянием стресс-факторов и в онтогенезе. Внимание сконцентрировано на участии АЦ в защите фотосинтетического аппарата. Обсуждены перспективы дальнейших исследований и использования АЦ в качестве индикатора состояния растительного организма. Отмечено значение этих соединений для человека и его здоровья.

Ключевые слова: антоцианы, биосинтез, локализация, онтогенез, регуляция, стресс-факторы, структура, флавоноиды, фотосинтетический аппарат, функции

DOI: 10.31857/S0015330323600547, **EDN:** ZFCNFX

ВВЕДЕНИЕ

Растения синтезируют тысячи разнообразных веществ — продуктов вторичного (специализированного) метаболизма. Они прямо не участвуют в основном обмене, росте и развитии, но играют важную роль во взаимодействии растительного организма с окружающей средой [1]. Стрессы усиливают синтез продуктов вторичного метаболизма, химическое разнообразие которых в большинстве случаев видоспецифично [2, 3]. Среди вторичных метаболитов наиболее распространены соединения фенольной природы [1], в них заключено более 40% циркулирующего в биосфере органического углерода [4]. Флавоноиды — основной класс полифенолов, широко представленных в растительном царстве. В настоящее время известно около 6000 флавоноидов [5]. Все они имеют 15-углеродный скелет, состоящий из двух ароматических колец, каждое из которых содержит 6 атомов углерода. Кольца соединены С3-фрагментом, образующим кислородсодержащее гетероциклическое кольцо.

Флавоноиды включают обширную группу окрашенных пигментов — антоцианов (в англоязычной литературе “антоцианины”). Слово “антоцианин” происходит от греческих *ἄνθος* — цве-

ток и *κυανός* — синий, лазоревый. В 1835 г. немецкий фармацевт Л. Маркварт в трактате “Цвета цветов” дал название “антоциан” химическому соединению, придающему синюю окраску цветкам [цит. по 6]. Строение антоцианов установлено в 1913 г. известным немецким биохимиком Р. Вильштеттером, а спустя 15 лет английский химик Р. Робинсон осуществил их синтез. С тех пор не утихают дебаты о роли АЦ в жизнедеятельности растений [6–12].

В данном обзоре обобщены современные сведения о биосинтезе антоцианов, роли в растениях (с акцентом на их функции в листьях) и значимости для человека, рассмотрены перспективы дальнейших исследований.

СТРУКТУРА, БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ

Для понимания функции тех или иных соединений важны знания об их химической структуре и свойствах, путях и молекулярно-генетических механизмах регуляции биосинтеза. АЦ представляют собой полигидрокси- и полиметокси- производные 2-фенилбензопирилевого катиона (флавилиевого катиона) [13]. Флавилиевый катион является агликоном (рис. 1а). Известно более двух десятков антоциановых агликонов (антоцианидинов, АЦД), отличающихся присутствием гидрокси- (ОН) и метокси- (ОСН₃) групп в кар-

Сокращения: АЦ — антоцианы, ВКЦ — виолаксантиновый цикл, ФСА — фотосинтетический аппарат, qP и NPQ — фотохимическое и нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* ФСII, TF — транскрипционный фактор.

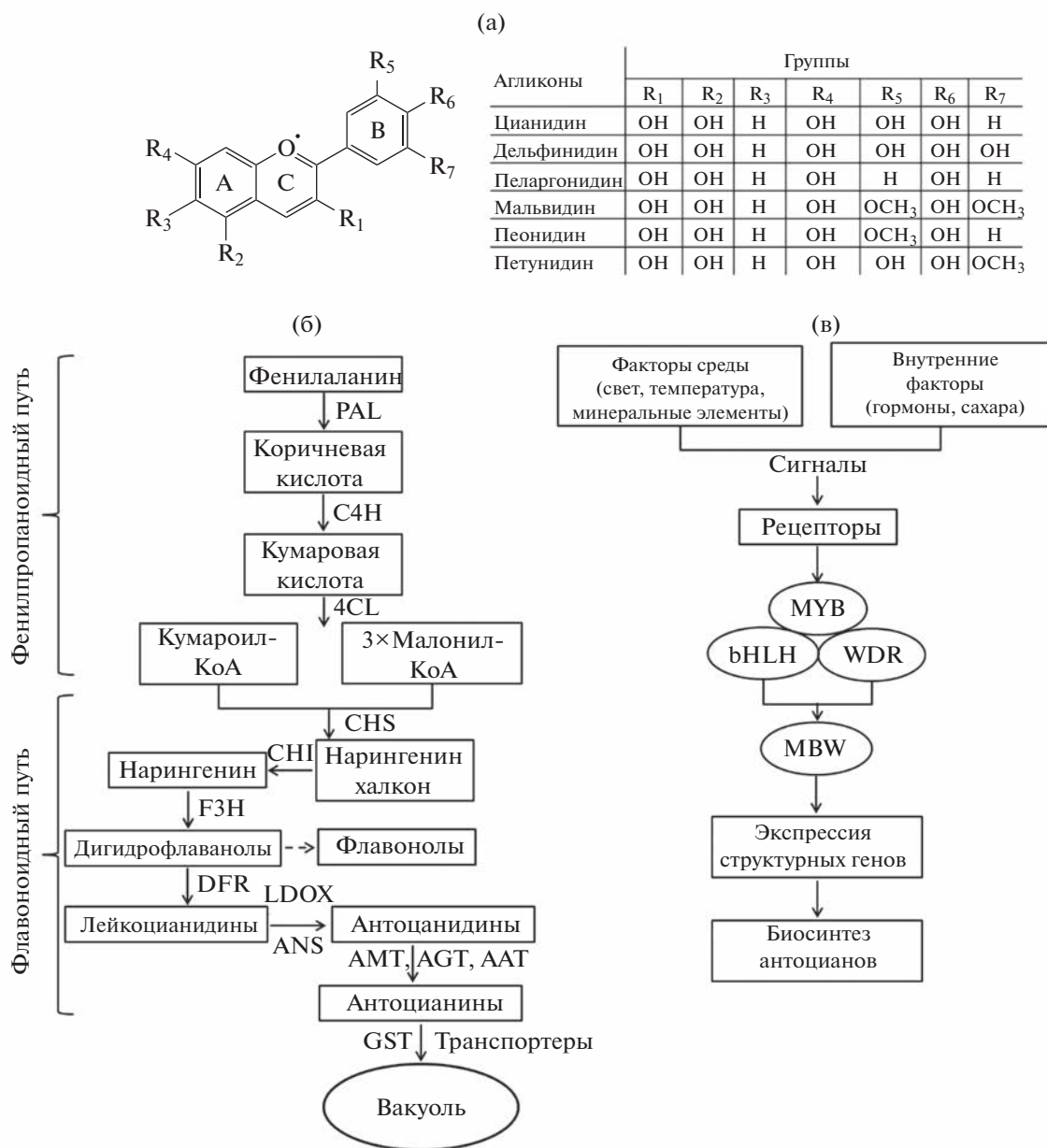


Рис. 1. Базовая структура антоцианидинов (а); схема и ферменты биосинтеза антоцианов (б): PAL – фенилаланин-аммиак-лиаза, C4H – циннамат-4-гидроксилаза, 4CL – 4-кумароил-КоА-лигаза, CHS – халконсинтаза, CHI – халконизомераза, F3H – флавонон-3-гидролаза, DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза, LDOX/ANS – лейкоантоцианидин-диоксигеназа/антоцианидинсинтаза, AMT – антоцианидинметилтрансфераза, AGT – антоцианидингликозилтрансфераза, AAT – антоцианидинацетилтрансфераза, GST – глутатион-S-трансфераза; упрощенная схема регуляции синтеза антоцианов (в): MYB, bHLH, WDR – транскрипционные факторы, образующие MBW-комплекс. Остальные пояснения в тексте.

касе [13, 14]. Антоцианы являются гликозидированными антоцианидинами, у которых представленная остатками гексоз углеводная составляющая связана с ОН-группой кольца в первом (R₁) или втором положении (R₂) [15]. В гликозидировании участвуют преимущественно моносахариды (глюкоза, галактоза, рамноза, арабиноза), в некоторых случаях – ди- и трисахариды. АЦ могут быть ацилированы кумаровой, кофейной, феру-

ловой и некоторыми другими органическими кислотами путем образования сложноэфирных связей, обычно в первом положении углеводного остатка [16]. Несмотря на структурное разнообразие, большинство встречающихся в растениях антоцианов являются производными неметилованных АЦД – цианидина, дельфинидина, пеларгонидина и метилированных – пеонидина, мальвидина, петунидина [17].

Антоцианы придают окраску (от розовой до синей) различным тканям и органам растений. Широкий цветовой спектр АЦ зависит от структурной формулы пигмента (степени гидроксирования, количества или типа замещенных групп), его концентрации, pH среды, образования комплексов с катионами металлов. Увеличение количества гидроксильных групп усиливает окраску и делает ее более синей [13]. АЦ присутствуют в лепестках цветков, плодах, ягодах и семенах, листьях, стеблях и даже корнях [6]. Листья накапливают АЦ преимущественно в клетках адаксиальной эпидермы и верхних слоев мезофилла, реже в клетках абаксиальной эпидермы и губчатого мезофилла [18]. АЦ окрашивают лепестки венчика цветков [15], кожу и паренхимные клетки околоплодника сочных плодов [6]. У большинства злаковых культур АЦ локализируются в перикарпе и алейроновом слое зерновок [19, 20]. АЦ являются важным показателем созревания ягод и фруктов, качества продуктов их переработки. Экстракты, содержащие АЦ, используют как природные красители в пищевой и текстильной промышленности.

Биосинтез флавоноидов представляет собой один из наиболее полно охарактеризованных метаболических путей растений [15, 17, 21, 22]. Он осуществляется на поверхности эндоплазматического ретикулума, обращенной к цитозолю. Ферменты, участвующие в биосинтезе флавоноидов, образуют мультиферментный комплекс — флавоноидный метаболон [22].

Первые этапы синтеза всех групп флавоноидов начинаются с халкона, который образуется из 4-кумароил-КоА и трех молекул малонил-КоА при участии фермента халконсинтазы (CHS) (рис. 1б). 4-кумароил-КоА образуется из фенилаланина с участием фермента фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL). Под действием халконизомеразы (CHI) халкон превращается во флаван, являющийся предшественником синтеза многих флавоноидов. Превращения флавана нарингенина дает начало образованию широкого спектра олигомерных и полимерных антоцианидинов. Фермент флаванон-3-гидроксилаза (F3H) гидроксилирует флавононы с образованием ди-гидрофлавонолов, которые необходимы для синтеза АЦД и флавонолов. На следующем этапе ди-гидрофлавонол-4-редуктаза (DFR) восстанавливает ди-гидрофлавонолы до лейкоантоцианидинов. Затем лейкоантоцианидиноксигеназа (LDOX) и антоцианидин-синтаза (ANS) катализируют 2-оксо-глутаратзависимое окисление лейкоантоцианидинов во 2-флаван-3,4-диолы (антоцианидины). Гликозилирование и ацилирование придают стойкость и окраску этим соединениям. Процесс гликозилирования осуществляется с участием антоцианидин-глюкозилтрансферазы (AGT), метилирования — с участием антоцианидин-метилтрансферазы (AMT), ацилирования — с участием антоцианидин-ацетилтрансферазы (AAT).

АЦ транспортируются из эндоплазматического ретикулума в вакуоль с помощью глутатион-S-трансферазы (GST). Конъюгированные с GST АЦ транспортируются через тонопласт МАТЕ- или АВС-транспортёрами, а также в везикулах [23, 24]. Для функционирования МАТЕ-мембранных транспортёров требуется наличие градиента H^+ , который обеспечивается АТФ-азами V-типа и пироглутатазами. АВС-мембранные транспортёры не нуждаются в наличии такого градиента. Везикулярный транспорт АЦ из эндоплазматического ретикулума прямо (минуя аппарат Гольджи) в запасующие белок вакуоли был отмечен у проростков резуховидки Таля [25]. В вакуолях АЦ могут взаимодействовать с другими молекулами, например, белками, образуя стабильные антоциановые включения.

Изучение путей биосинтеза в комбинации с методами транскриптомного анализа позволили идентифицировать гены, участвующие в метаболизме флавоноидов [15, 21, 26, 27]. Их делят на две группы: ранние гены биосинтеза, включающие гены белков-ферментов общих для различных флавоноидных путей (CHS, CHI, F3H) и поздние гены (DFR, LDOX и AGT) [28, 29].

Экспрессия генов ферментов, участвующих в биосинтезе АЦ, тонко регулируется и жестко контролируется специфическим белковым MBW-комплексом, который формируется при взаимодействии транскрипционных факторов (TFs) типа MYB, bHLH и WDR [30].

MYB-белки представляют собой класс полифункциональных TFs, характеризующихся наличием от одного до четырех неполных MYB-повторов (R), придающих им способность связывать ДНК [31]. Каждый MYB-повтор содержит около 52 аминокислот, образуя три α -спирали [32]. В растениях самой большой группой белков MYB является R2R3-MYBs, содержащие два повтора MYB [31, 33]. С использованием геноспецифичных праймеров было показано, что три MYB-активатора синтеза АЦ у яблони (MYB10/MYB1/MYBA) являются аллелями [33]. Экспрессия генов MYB10 коррелировала с содержанием АЦ в плодах и цветках. Идентичные генам яблони MYB TFs были выделены из коммерчески ценных видов семейства Розоцветные. Белки MYB могут действовать не только как активаторы транскрипции, но и как ее репрессоры [34]. В неиндуктивных условиях R2R3-активаторы MYB не экспрессируются, в то время как репрессоры MYB ингибируют экспрессию генов-мишеней непосредственно или препятствуют взаимодействию MYB с bHLH, чтобы предотвратить образование комплексов MBW. Shi с соавт. [35] представили данные, свидетельствующие о том, что MYB6 транскрипционный фактор плодов *Myrica rubra* в составе MBW комплекса подавлял накопление антоцианидинов и протоантоцианинов, ингибируя промоторы генов ферментов их биосинтеза.

Суперсемейство транскрипционных факторов bHLH активирует экспрессию множества генов, взаимодействуя со специфическим промотором. Они участвуют в регуляции процессов развития и метаболизма, включая синтез вторичных метаболитов, а также в реакции растений на стрессовые воздействия факторов внешней среды [36]. Паттерн экспрессии и ДНК-связывающая специфичность белков R2R3-Myb и bHLH определяют множество активируемых комплексом MBW генов. Белки семейства WD40 характеризуются наличием высоко симметричных повторов (обычно 4–10), образующих структуру, облегчающую белок-белковые взаимодействия [37]. Показано, что взаимодействие гена MrWD40-1 с MYB и bHLH усиливало накопление АЦ в плодах *Myrica rubra* [38]. Повышенную экспрессию генов WD40-1 и WD40-2 отмечали в различных органах и тканях пшеницы и ячменя, независимо от их пигментации [39], что свидетельствует об участии этих генов не только в синтезе АЦ, но и в регуляции биосинтеза других флавоноидов.

Комплекс MYB-bHLH-WD40 контролирует скорость транскрипции поздних генов биосинтеза АЦ [40]. У декоративного растения *Brassica oleracea* var. *acephala* с антоциановыми листьями в центре розетки было идентифицировано три MYB, шесть bHLH и один WDR транскрипционный фактор [41]. Листья красной декоративной капусты отличались более высоким уровнем экспрессии генов ферментов позднего биосинтеза, тогда как у линий белой капусты экспрессия этих генов была выражена слабо. Транскриптомный анализ выявил 2286 дифференциально экспрессируемых генов в листьях фиолетовой и зеленой форм *Brassica juncea* [42]. Причем 1593 из них регулировались на повышение экспрессии, а 693 генов, наоборот, на понижение. Среди них было 213 дифференциально экспрессируемых TFs. MYB и bHLH TFs в окрашенных листьях регулировались на повышение, что приводило к активации накопления АЦ. Экспрессия структурных генов ферментов CHS, F3H, DFR, LDOX и GST, была конститутивно повышена на всех стадиях вегетативного роста у листьев красных сортов *B. oleracea* с высоким содержанием АЦ. Интересно отметить, что в пурпурных листьях были активированы также большинство генов, участвующих во взаимодействии растения с патогенами.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ

Изучение функций АЦ, как правило, предполагает получение данных о динамике содержания этих пигментов. Для определения концентрации АЦ чаще всего используют спектрофотометрию и/или хроматографию [43]. Наиболее простой метод заключается в подкислении содержащего АЦ метанольного экстракта 1% HCl и измерении общего количества АЦ спектрофотометрически

при длине волны 535 нм с последующим вычитанием неспецифического поглощения при 700 нм. Данный метод имеет низкую специфичность, так как все красные пигменты фенольной природы определяются как АЦ. Другой метод основан на способности АЦ к обратимой структурной трансформации и изменению оптических свойств в зависимости от кислотности среды [44]. При pH 1 АЦ существует в виде красного катиона флавилия (AH^+), а при pH 4.5 пигмент находится в форме бесцветного гемикетала (В). Следовательно, разница в поглощении света отражает концентрацию пигмента. Однако полимерная форма АЦ (продукты полимеризации мономерных АЦ, которые могут присутствовать в экстрактах) устойчива к изменению цвета при изменении pH и выглядит красной как при pH 1, так и при pH 4.5 и не измеряется pH-дифференциальным методом. Данный метод позволяет измерить мономерные АЦ, но не у всех видов растений [45]. Для определения содержания и качественного состава АЦ в настоящее время все чаще применяется метод жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, что позволяет идентифицировать индивидуальные АЦ [46, 47].

Применение химических методов связано с деструкцией образца. Избежать этого позволяет метод спектроскопии отражения, основанный на определении спектров отражения органов растений [48, 49]. В области видимого излучения АЦ поглощают в основном зеленые лучи, в меньшей степени синие и слабо поглощают красные лучи. Для оценки содержания АЦ предложен спектральный индекс ARI (Anthocyanin Reflectance Index), вычисляемый по формуле: $\text{ARI} = (1/R_{550} - 1/R_{700}) \times R_{800}$. Отношение $1/R_{550}$ чувствительно к содержанию антоцианов, а $1/R_{700}$ — к содержанию хлорофиллов, что позволяет внести поправку на вклад этих пигментов в поглощение при 550 нм. Коэффициент R_{800} позволяет учесть гетерогенность оптических свойств листьев, не зависящих от поглощения света пигментами.

Применимость данной формулы подтверждена прямыми определениями концентрации АЦ у многих растительных объектов. Так, например, нами было показано, что изменения величины индекса ARI соответствовали динамике изменения концентрации АЦ в онтогенезе зимующих листьев растений *Ajuga reptans* [50].

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ И ВНУТРЕННИХ ФАКТОРОВ НА БИОСИНТЕЗ АНТОЦИАНОВ

Экспрессия синтеза АЦ находится под онтогенетическим контролем и зависит от внешних условий [7, 9, 17, 51]. Онтогенетическое развитие и факторы окружающей среды могут индуцировать MYB TFs, которые затем активируют WDR и bHLH с образованием MBW-комплекса, контро-

лирующего скорость транскрипции генов биосинтеза АЦ (рис. 1в).

Свет является основным фактором, индуцирующим синтез АЦ. Тот факт, что без света вообще нет синтеза АЦ убедительно показывают опыты с культурой баклажана (*Solanum melongena*) [52]. У изолированных от света плодов кожица оставалась белой. На естественном свету плоды становились фиолетовыми, максимум накопления АЦ в кожице отмечали через 10–12 суток экспозиции на свету. Свет индуцировал биосинтез АЦ через активацию MBW-комплекса и экспрессию генов-мишеней, регулируемых на транскрипционном и трансляционном уровнях.

Информация, обобщающая современные знания о молекулярных механизмах регуляции биосинтеза АЦ различными факторами (свет, температура, сахара, гормоны), представлена Gu с соавт. [24]. Согласно приведенной в данной работе схеме, световой контроль осуществляется с помощью рецепторов ультрафиолетового излучения (UVR8), криптохромов (CRYs) и фитохромов (PHYs), взаимодействующих с убиквитин-Е3-лигазой COP1 (Constitutive Photomorphogenic1), которая опосредует деградацию множества эффекторов светочувствительности, включая HYP5 (Elongated hypocotyl5), или непосредственно взаимодействуют с MYBs, связанными с биосинтезом АЦ. Температура усиливает синтез АЦ, активируя экспрессию гена SIZ1 лигазы SUMO E3, сумоилирующей и стабилизирующей определенные MYB TFs.

Среди дифференциально экспрессируемых генов, участвующих в регуляции индуцируемого пониженной температурой синтеза АЦ в листьях *Malus domestica*, преобладали гены и TFs путей синтеза флавоноидов [53]. Экспрессия трех MYB TFs (MdMYB12, MdMYB22 и MdMYB114) при воздействии низкой температуры, тесно коррелировала с накоплением АЦ. Накопление АЦ при низкотемпературном стрессе нередко ассоциируется с повышением концентрации растворимых углеводов. По-видимому, специфические для сахарозы сигнальные пути стимулируют как выработку фруктанов, так и антоцианов, при этом центральную роль играют факторы транскрипции MYB-типа и строгая зависимость от ионов Ca^{+2} как вторичного мессенджера [54].

Сенсор глюкозы HXK1 (гексокиназа1) фосфорилирует и стабилизирует bHLH TFs, связанные с биосинтезом АЦ [24]. Сенсор сахарозы SnRK1 — эволюционно консервативный протеинкиназный комплекс, регулирующий энергетический гомеостаз в растениях, способствует повышению толерантности к неблагоприятным условиям окружающей среды, влияя на широкий спектр процессов роста и развития [55]. Он взаимодействует с определенными белками JAZ (TFs семейства Jasmonate ZIM-домена) и фосфорилирует их, регу-

лируя индуцированное сахарозой накопление АЦ. Растительные гормоны жасмонат, абсцизовая кислота, ауксин и некоторые другие факторы являются ключевыми в регуляции биосинтеза АЦ в процессе онтогенеза.

Имеющиеся в литературе сведения о влиянии минерального питания и токсических ионов в корнеобитаемой среде на синтез АЦ обобщены недавно Jezek с соавт. [56]. Листья разных видов растений приобретали антоциановую окраску при дефиците азота, фосфора, серы, меди, бора и других элементов. В условиях азотного голодания окраска проявлялась у старых листьев, экспортирующих азот в более молодые. Реутилизация азота сопровождалась распадом хлорофилла в старых листьях. Дефицит фосфора индуцировал сначала покраснение стеблей, черешков, основания листьев и жилок, и только затем антоциановая окраска распространялась по всей листовой пластинке. В отличие от азотного голодания, сопровождающегося хлорозом, содержание хлорофиллов при дефиците фосфора повышалось, и листья становились темно-голубовато-зелеными. Изменение содержания АЦ в листьях при дефиците азота и фосфора положительно коррелировало с концентрацией растворимых сахаров. Накопление сахаров в хлоропластах и/или цитозоле и повышенный уровень генерации АФК могут служить сигналом к усилению биосинтеза АЦ при дисфункции минерального питания.

Биосинтез АЦ чувствителен к ряду химических соединений, действующих прямо или с участием TFs. Так, например, обработка проростков *Arabidopsis thaliana* тирозином (предшественник меланина в пигментных клетках меланоцитах) вызывала экспрессию генов поздних этапов биосинтеза АЦ, включая DFR, LDOX и AGT, а также генов TFs PAP1, PAP2 и EGL3 [57]. Обработка растений красной капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata*) изофлавоноидом генистеином на свету положительно влияла на экспрессию всех структурных генов и накопление АЦ в листьях [58]. В темноте такую реакцию проявляли только гены ранних этапов биосинтеза АЦ. Действие генистеина на гены было прямым, без участия TFs. Мелатонин оказывал умеренное влияние на гены ранних и поздних этапов биосинтеза АЦ в темноте. На свету эффект мелатонина усиливался, причем положительную реакцию проявляли не только структурные гены, но и гены транскрипционных факторов MYB, bHLH и WD40.

Хотя биосинтез АЦ и молекулярные механизмы его регуляции достаточно хорошо изучены, по мнению Agati с соавт. [11] выявление функциональной значимости накопления флавоноидов в растениях является не столько молекулярно-биологической, сколько эколого-физиологической задачей. Наш взгляд, для более полного понимания роли АЦ необходимы комплексные исследования, интегрирующие знания из разных областей эксперимен-

тальной биологии растений, включая физиологию, биохимию и молекулярную биологию.

РОЛЬ АНТОЦИАНОВ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

АЦ чаще всего накапливаются, когда процессы развития делают растения более чувствительными к условиям окружающей среды. Выживание растений при стрессе в значительной степени зависит от сохранения фотосинтетического аппарата (ФСА) и, следовательно, листовой поверхности. Считается, что наиболее подвержены стрессу ювенильные листья. Замечено, что развивающиеся листья многих видов растений тропических лесов довольно часто накапливают значительное количество АЦ, что на фоне низкого содержания зеленых пигментов придает им яркую окраску. Среди гипотез о функциональной роли АЦ в листьях можно выделить защиту от различных вредителей, фотозащиту и нейтрализацию АФК. По мнению ряда исследователей [59, 60], АЦ снижают риски повреждения ювенильных листьев фитофагами и патогенами. Однако АЦ составляют лишь небольшую долю от пула фенольных соединений и других продуктов вторичного метаболизма, которые в большей степени, чем АЦ, способны ограничивать действие вредителей [60]. Предполагается также, что АЦ являются побочным продуктом метаболизма других флавоноидных соединений и/или способом запасаания углерода.

Идеи о фотозащитной роли АЦ основываются на множестве фактов о фотоиндукции биосинтеза АЦ на интенсивном свете и снижении их содержания в листьях разных видов травянистых и древесных растений при затенении. Нарушение баланса между поглощением световой энергии и ее использованием на фотосинтез опасно для клетки, так как может привести к развитию фотоокислительного стресса и деструкции ФСА. Молодые листья легче подвергаются стрессу вследствие неполного развития ФСА и его систем фотозащиты [61]. Накапливаясь, главным образом, в эпидермисе и верхних слоях мезофилла, АЦ экранируют ФСА и повышают фотостабильность листьев [18, 62, 63]. Некоторые авторы полагают, что в дополнение к ослаблению видимого света АЦ участвуют в обезвреживании АФК, проявляя тем самым антиоксидантные свойства [64]. Антиоксидантные свойства флавоноидов основаны на их способности взаимодействовать со свободными радикалами, а также хелатировать ионы металлов, участвующих в перекисном окислении.

Накопление АЦ в листьях чаще всего наблюдается в случаях, когда другие способы фотозащиты недостаточно эффективны. Например, молодые листья *Machilus chinensis* не накапливали АЦ, но имели более высокий уровень нефотохимического тушения энергии возбуждения [65]. Известно, что показатель нефотохимического ту-

шения флуоресценции хлорофилла *a* ФС II (NPQ) связан с работой виолаксантинового цикла (ВКЦ), осуществляющего тепловую диссипацию избыточно поглощенной световой энергии, тем самым, предотвращая ее передачу в реакционный центр ФС II и перевосстановление переносчиков фотосинтетической ЭТЦ. В отличие от *M. chinensis*, листья *Castanopsis chinensis* характеризовались низкой активностью антиоксидантных ферментов и величиной NPQ, но имели высокий уровень экспрессии генов, связанных с биосинтезом АЦ. Очевидно, накопление АЦ в молодых листьях *C. chinensis* способствует фотоадаптации, компенсируя недостаточную фотозащиту, обеспечиваемую за счет механизма нефотохимического тушения и антиоксидантной системой.

Способность накапливать АЦ часто ограничивается ювенильной фазой и теряется с возрастом. По данным [66] содержание АЦ в листьях листопадных видов древесных растений снижалось по мере формирования ФСА, о чем судили по накоплению фотосинтетических пигментов, увеличению удельной поверхностной плотности листьев, дифференциации мезофилла на губчатый и палисадный слои. Фотосинтетический газообмен положительно коррелировал с толщиной листа и отрицательно с содержанием АЦ. При этом виды с более медленным формированием ФСА позже теряли антоциановую окраску. Соотношение хлорофилла *a/b* увеличивалось с возрастом листа и было ниже, чем у видов с листьями, не накапливающими АЦ, что согласуется с идеей об их затеняющей функции. Сходные закономерности отметили Solovchenko и Chivkunova [67] у молодых листьев на периферии кроны *Corylus avellana*, накапливающих АЦ в клетках верхнего и нижнего эпидермиса. Насыщение светом скорости линейного транспорта электронов у красных листьев наблюдали при более высокой плотности потока ФАР, чем у зеленых. Причем у ювенильных красных листьев эта величина была близка к таковой у зрелых зеленых листьев, устойчивых к высокой интенсивности солнечной радиации. Более того, листья с антоциановой окраской мало отличались от зеленых по величине NPQ, а также содержанию и уровню дезоксидации пигментов ВКЦ. Авторы связывают устойчивость ФСА молодых красных листьев к избыточной радиации с экранирующей и фотопротекторной функцией АЦ.

По мнению Zhu с соавт. [68], в условиях недостаточной фотозащиты АЦ действуют как светофильтр, предотвращающий повреждение ФСА избыточной инсоляцией. Этот вывод был основан на результатах изучения динамики содержания пигментов, антиоксидантной способности и фотосинтеза молодых и зрелых листьев вечнозеленого древесного растения *Acmena acuminatissima*. Молодые листья постепенно краснели, а зрелые оставались зелеными осенью (август–январь) при снижении средней за сутки темпе-

ратуры до 13°C и максимальной освещенности до 1000 мкмоль квантов/(м² с). Накопление АЦ компенсировало недостаточную фотозащиту молодых листьев в условиях, когда тепловой диссипации энергии возбуждения хлорофилла было недостаточно для тушения ее избытка.

Тот факт, что накопление АЦ способствует снижению светового давления на ФСА и предотвращает фотоингибирование убедительно доказывают результаты опытов с пестролистными растениями. Так, например, пурпурные части листа *Coleus x hybridus* отличались более низкими величинами фотохимического тушения (qP) и NPQ, чем зеленые [69]. Пурпурные листья пуансетии (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) после экспозиции на сильном свете сохраняли высокую фотохимическую активность, тогда как у зеленых листьев величина максимальной фотохимической эффективности ФС II (Fv/Fm) снижалась в 2 раза [70]. На интенсивном свете красные листья пуансетии отличались от зеленых более высоким реальным квантовым выходом ФСП (Ф_{ФСП}), меньшей величиной давления возбуждения (1-qP) и низкой генерацией H₂O₂ [71], что указывает на фотопротекторную функцию АЦ. Кроме того, красные листья накапливали существенно меньше H₂O₂ при обработке индуктором окислительного стресса метилвиологеном. Это означает, что АЦ дополняют работу антиоксидантной системы по предотвращению развития фотоокислительного стресса.

Затеняющий эффект АЦ может проявляться в снижении ассимиляции. Так, красные листья *Oxalis triangularis* заметно уступали зеленым по скорости фотосинтеза, но характеризовались более высоким квантовым выходом ФС II, что указывает на более низкий уровень фотоингибирования [72].

Согласно нашим данным [73], красно-фиолетовые листья *Hylotelephium triphyllum* содержали в 7 раз больше АЦ и в 1.6 раза меньше хлорофиллов, чем зеленые. При этом листья с антоциановой окраской отличались от зеленых более высокими величинами (на 10–15%) квантового выхода фотохимии ФС II и пониженным уровнем NPQ. Следовательно, АЦ способствовали снижению светового давления на ФСА окрашенных листьев.

Затеняя хлоропласты, АЦ не только снижают количество поступающего к ним света, но трансформируют его качество, поглощая в основном зеленые лучи. При низком содержании хлорофиллов АЦ перехватывают значительную часть солнечной радиации зеленой части спектра (510–560 нм), где поглощение хлорофиллов слабое, и синей (400–500 нм), где находятся максимумы поглощения хлорофиллов и каротиноидов [74]. Имеются данные, что АЦ поглощали до 40% падающей ФАР в области 400–600 нм и снижали, тем самым, квантовый выход ассимиляции CO₂ в листьях кукурузы [75].

В литературе имеются сведения о влиянии качества света на накопление АЦ. Так, листья черники (*Vaccinium corymbosum* L.) при освещении синим и синим в сочетании с красным светом накапливали в 4 раза больше АЦ, чем на белом свете [76]. Синий свет индуцировал экспрессию генов ферментов LDOX, AGT и AMT, способствуя синтезу цианидина, пеларгонидина и мальвидина. Комбинация красного и синего света усиливала регуляцию DFR и AMT, что приводило к накоплению дельфинидина, петунидина и пеонидина. При этом максимальная скорость нетто-ассимиляции была в 2 раза ниже, а количество молей квантов, необходимых для ассимиляции моля CO₂ (квантовый выход фотосинтеза), в 1.5 раза выше, чем на белом свете. Эти данные указывают на существование обратной (регуляторной) связи между фотосинтезом и содержанием АЦ.

Ультрафиолетовые лучи (УФ), достигающие поверхности Земли, составляют небольшую долю солнечного излучения, но они несут богатые энергией кванты и опасны для живых клеток. УФ-В радиация (280–315 нм) способна повредить биологически важные макромолекулы (ДНК, белки и др.). В ответ на действие УФ растения накапливают в клетках фенольные соединения, препятствующие развитию окислительного стресса. Среди фенольных соединений наибольшей способностью инактивировать АФК обладают флавоноиды [77]. Причем АЦ эффективней, чем другие полифенолы, снижают концентрацию H₂O₂ [78]. Контроль содержания H₂O₂ имеет большое значение, поскольку эта молекула является сигнальной и способна передавать сигналы на более далекие расстояния, чем другие АФК. Кроме того, поглощая УФ, АЦ экранируют клетки и смягчают индуцируемый УФ окислительный стресс [18].

Нами было показано, что ежедневная (в течение 12 дней) кратковременная экспозиция к УФ-В радиации листового салата, культивируемого в зимней теплице, приводила к накоплению полифенолов и повышению антиоксидантной активности растений [79]. Содержание фенольных соединений увеличилось в среднем на 25%. Сорта Барбадос и Скороход с конститутивной способностью к синтезу АЦ при обработке УФ-В накапливали в основном АЦ, тогда как сорт Афицион с зелеными листьями синтезировал другие фенольные соединения. Продолжительность и доза УФ-В были подобраны таким образом, что не повлияли на урожайность салата. Такой способ обработки растений позволяет улучшить полезные свойства тепличной продукции без потери продуктивности.

Хорошо известен феномен покраснения листьев листопадных деревьев осенью. В умеренных широтах это явление наблюдается примерно у 10% видов, а в некоторых регионах, например, в

смешанных лесах Новой Англии (США) их численность достигает 70% [80]. Вдохновляющие поэтов “в багрец и золото одетые леса” являются предвестником наступления скорого суицида листьев. Вопрос о том, является ли индукция синтеза АЦ атрибутом старения и последующего отмирания листьев остается дискуссионным [12, 81]. Старение листьев — сложный и тонко регулируемый процесс, связанный с реутилизацией продуктов распада и необратимой потерей хлорофилла. Ассоциацию фенилпропаноидного метаболизма со старением и интеграцию старения с развитием и адаптацией считают эволюционно недавней инновацией наземных растений [82].

Среди экологов активно обсуждается идея, согласно которой красный цвет листьев — сигнал для вредителей о наличии химической защиты и низком содержании питательных веществ [81, 83]. По мнению других исследователей, феномен покраснения листьев во время осеннего снижения температуры, освещения полога и распада хлорофилла связан с ролью АЦ в фотозащите [84]. В работе [85] показано, что в краснеющих листьях листопадного древесного растения *Liquidambar formosana* уменьшалось число хлоропластов, разрушались тилакоиды, снижались концентрация хлорофиллов и скорость фотосинтеза. Это сопровождалось падением фотохимической активности, скорости транспорта электронов и увеличением NPQ. На таком фоне наблюдали накопление растворимых сахаров и активацию биосинтеза АЦ. Когда содержание АЦ достигло 2,5 мг/г сырой массы листьев, генерация АФК снизилась, показатели фотосинтеза стабилизировались. Следовательно, накопление АЦ в листьях приводило к торможению развития фотоингибирования.

По нашим данным [50], у зимующих листьев *Ajuga reptans* максимум накопления АЦ наблюдался после выхода растений из-под снега (апрель) на фоне уменьшения содержания зеленых пигментов, распада крупных пигмент-белковых комплексов, увеличения концентрации несвязанного хлорофилла и сравнительно высокого уровня дезоксидации пигментов ВКЦ. Эти находки позволяют полагать, что в ранневесенний период при пониженной температуре и высокой инсоляции ВКЦ и АЦ совместно обеспечивали защиту ФСА и сохранение листьями фотосинтетической активности. По-видимому, метаболическая цена синтеза АЦ компенсируется теми преимуществами, которые данный вид получает от жизнедеятельности перезимовавших и уже начинающих стареть листьев.

Фотозащита позволяет листьям дольше оставаться активными в период старения, что способствует более полной реутилизации продуктов катаболизма и, в первую очередь, азотсодержащих соединений [86]. Такая стратегия особенно важна для растений на бедных азотом почвах [87]. Косвенно об этом свидетельствуют результаты исследования 126 видов лесных растений [80]. Ни один

из видов, получающих азот за счет биологической азотфиксации, не содержал АЦ в стареющих листьях осенью, тогда как почти половина видов без симбионта накапливали АЦ. Некоторые авторы [88] полагают, что затраты энерго-пластических веществ на синтез АЦ способствуют снятию фотосинтетического контроля, что позволяет ФСА генерировать энергию, необходимую для реутилизации питательных веществ. Проанализировав массив данных о биосинтезе АЦ в листьях листопадных растений осенью, авторы работы [87] заключили, что, по всей видимости, АЦ выполняют множество функций, от сигнала для насекомых до фотопротекции, направленной на снижение окислительного стресса и создание условий для реутилизации питательных веществ.

Согласно многочисленным данным, синтез АЦ усиливается при стрессах разной природы, что способствует защите и повышению устойчивости растений [7, 9, 89–92]. Например, генотипы пшеницы с более высоким содержанием АЦ быстрее адаптировались и проявляли большую устойчивость к солевому стрессу [92]. В литературе имеются также сведения о влиянии поллютантов на содержание АЦ в растениях [93]. Некоторые авторы используют этот показатель для индикации состояния среды [94].

Таким образом, имеющиеся экспериментальные данные позволяют полагать, что АЦ являются элементом скоординированной системы защитных реакций, способствующих поддержанию редокс-баланса клеток, и накапливаются, когда активность других защитных систем недостаточна для подавления окислительного стресса.

АНТОЦИАНЫ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

АЦ являются растительными флавоноидами и поступают в организм человека и животных с пищей. Анализируя функции АЦ, нельзя не отметить их значимость как биоактивных соединений. Результаты исследований, свидетельствующие о биологической активности АЦ и пользе употребления богатой АЦ пищи для поддержания здоровья человека, представлены в многочисленных сводках [95–100]. Антоцианидины и антоцианы проявляют широкий спектр биологических и фармакологических свойств, включая антиоксидантную, противомикробную, противовоспалительную, противоопухолевую, противодиабетическую и антиатеросклеротическую активность. В модельных опытах *in vivo* показан защитный эффект АЦ против апоптоза, вызванного окислительным стрессом, в предотвращении мутагенеза и канцерогенеза. Накапливаются фактические данные о способности АЦ замедлять или останавливать прогрессирование возрастных нарушений здоровья и снижения когнитивных способностей. Имеются сведения о защитном действии АЦ

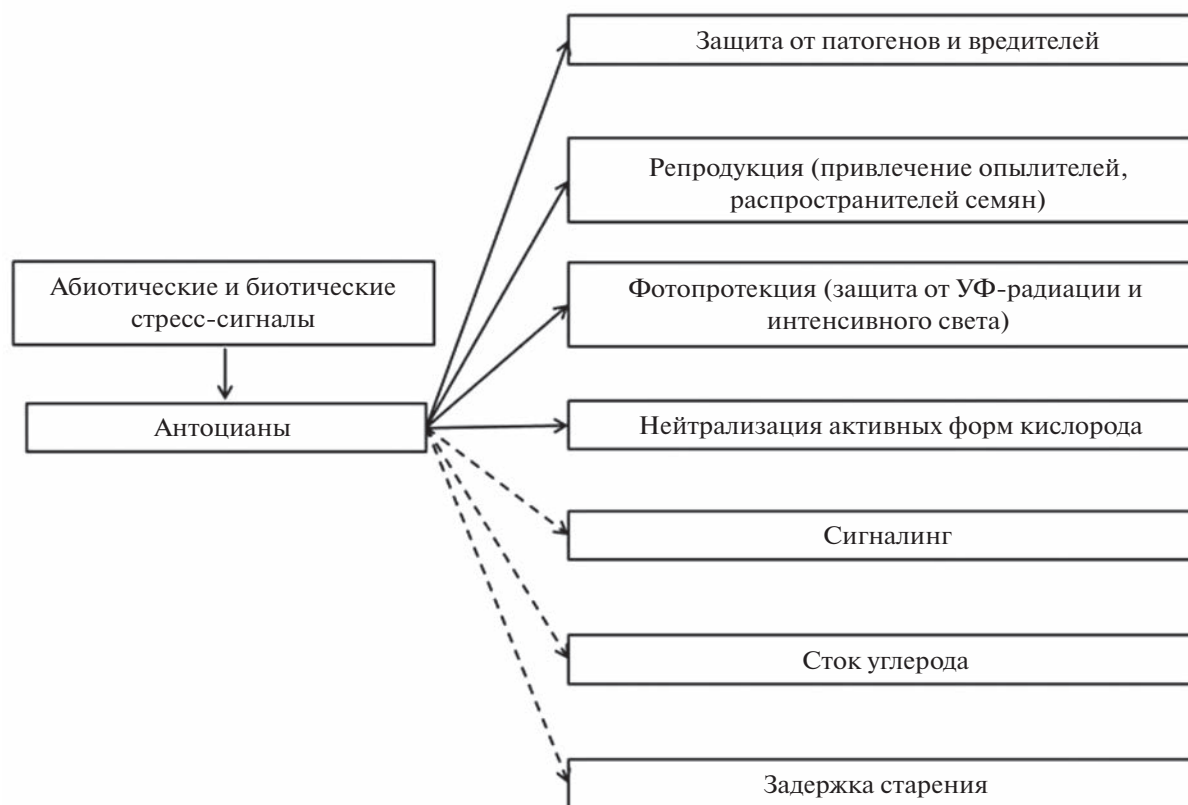


Рис. 2. Графическое представление роли антоцианов в растениях. Пунктирными стрелками указаны предполагаемые функции.

против окислительного повреждения сетчатки глаза, вызванного УФ излучением, а также положительном влиянии на ночное зрение.

Основным источником АЦ являются фрукты и овощи красно-фиолетового цвета. Согласно сводке, приведенной в работе [97], содержание АЦ в них может достигать 1500–1800 мг/100 г продукта (ягоды черники, бузины). Помимо фруктов и овощей заметное количество АЦ содержат окрашенные зерна злаков [100], черная фасоль, соя, бобы.

Для получения ценной продукции с высоким содержанием АЦ ведутся работы по совершенствованию технологии культивирования растений путем регуляции светового, водного и минерального режимов питания, использования биостимуляторов (гуминовые кислоты, экстракты морских водорослей, гидролизаты белков, аналоги гормонов роста, микроэлементы и т.п.) [17]. Для тепличного производства разрабатываются специальные пленки, трансформирующие интенсивность и качество света, светодиодные лампы с определенным спектром излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Антоцианы и антоцианидины — большая группа веществ флавоноидной природы, продукты

вторичного метаболизма. Они являются эволюционно более молодыми, чем хлорофиллы и каротиноиды, пигментами. АЦ обнаружены у многих таксонов голосеменных и покрытосеменных растений, они могут накапливаться практически во всех органах и частях растений. АЦ полифункциональны, их функции могут меняться в течение онтогенеза и варьировать от органа к органу. АЦ участвуют в регуляции многих процессов и являются частью интегрированной сети защитных и адаптивных реакций (рис. 2). Биосинтез АЦ зависит от внешних (абиотических и биотических) и внутренних факторов, ассоциированных с онтогенетическим развитием. К настоящему времени изучены биохимические пути, идентифицированы многие гены и транскрипционные факторы, участвующие в регуляции биосинтеза АЦ. Несмотря на это, функции АЦ в растениях все еще не до конца поняты и остаются предметом дискуссий. В первую очередь, это касается роли АЦ в клеточном сигналинге, поддержании редокс-баланса клеток, старении, взаимодействии АЦ с собственными фотозащитными механизмами фотосинтетического аппарата. Представляет интерес реакция флавоноидного метаболизма и биосинтеза антоцианов, в частности, на ожидаемые климатические изменения и усиление антропо-

генного пресса на природные экосистемы, возможность использования АЦ в качестве доступной визуальной наблюдению тест-системы.

Следует иметь в виду, что любой защитный механизм несовершенен. Все виды защиты сопряжены с затратами энерго-пластических веществ и, следовательно, требуют от организма принятия сбалансированного физиологического решения о целесообразности развития той или иной адаптивной реакции. В связи с этим интерес представляет вопрос о цене синтеза АЦ, включая биосинтез ферментов, белков, транскрипционных факторов и транспортеров.

Многочисленные исследования свидетельствуют о пользе для здоровья человека богатой АЦ пищи. Достижения в изучении биохимических путей, ферментов и молекулярно-генетических механизмов регуляции биосинтеза этих соединений открывают широкие перспективы развития биотехнологий для получения растительной продукции с определенным составом АЦ, повышения устойчивости растений к стрессам, а также создания новых форм пищевых и декоративных растений.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ “Фотосинтез, дыхание и биоэнергетика растений и фототрофных организмов (физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и экологические аспекты)” (рег. № 122040600021-4).

Автор выражает благодарность к. б. н. М.А. Шелякину за помощь в оформлении рисунков и списка литературы.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Носов А.М. Вторичный метаболизм // Физиология растений: учебник для студ. вузов. М.: Издательский центр “Академия”. 2007. С. 588.
2. Selmar D., Kleinweichter M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 817. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct054>
3. Salam U., Ullah S., Tang Z.-H., Elateeg A., Khan J., Khan A., Ali S. Plant metabolomics: an overview of the role of primary and secondary metabolites against different environmental stress factors // *Life.* 2023. V. 13. P. 706. <https://doi.org/10.3390/life13030706>
4. Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. Natural products (secondary metabolites) / *Biochemistry and molecular biology of plants* // Eds. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. Rockville, Maryland: Courier Comp., Inc. 2000. P. 1250.
5. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. Flavonoids: an overview // *J. Nutr. Sci.* 2016. V. 5:E47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
6. Карабанов И.А. Флавоноиды в мире растений. Минск: Ураджай, 1981. 80 с.
7. Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x>
8. Manetas Y. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? // *Flora.* 2006. V. 201. P. 163. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2005.06.010>
9. Landi M., Tattini M., Gould K.S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions // *Environ. Exp. Bot.* 2015. V. 119. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.012>
10. Gould K.S., Jay-Allemand C., Logan B.A., Baissac Y., Bidel L.P. When are foliar anthocyanins useful to plants? Re-evaluation of the photoprotection hypothesis using *Arabidopsis thaliana* mutants that differ in anthocyanin accumulation // *Environ. Exp. Bot.* 2018. V. 154. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.006>
11. Agati G., Brunetti C., Fini A., Gori A., Guidi L., Landi M., Sebastiani F., Tattini M. Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation // *Antioxidants.* 2020. V. 9. P. 1098. <https://doi.org/10.3390/antiox9111098>
12. Lev-Yadun S. The phenomenon of red and yellow autumn leaves: hypotheses, agreements and disagreements // *J. Evol. Biol.* 2022. V. 35. P. 1245. <https://doi.org/10.1111/jeb.14069>
13. Nurtiana W. Anthocyanin as natural colorant: a review // *Food SciencTech J.* 2019. V. 1. P. 1. <https://doi.org/10.33512/fsj.v1i1.6180>
14. Fernandez-Lopez J.A., Fernandez-Lledo V., Angosto J.M. New insights into red plant pigments: more than just natural colorants // *RSC Adv.* 2020. V. 10. P. 24669. <https://doi.org/10.1039/D0RA03514A>
15. Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 761. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105248>
16. Yoshida K., Mori M., Kondo T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology // *Nat. Prod. Rep.* 2009. V. 26. P. 884. <https://doi.org/10.1039/B800165K>
17. Mannino G., Gentile C., Ertani A., Serio G., Berteà C.M. Anthocyanins: biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods – a review // *Agriculture.* 2021. V. 11. P. 212. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030212>
18. Solovchenko A.E., Merzlyak M.N. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2008. V. 55. P. 719. <https://doi.org/10.1134/S1021443708060010>

19. Garg M., Chawla M., Chunduri V., Kumar R., Sharma S., Sharma N.K., Kaur N., Kumar A., Mundey J.K., Saini M.K., Singh S.P. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization // *J. Cereal Sci.* 2016. V. 71. P. 138.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.08.004>
20. Khlestkina E.K., Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Otma-khova Y.S., Usenko N.I., Tikhonova M.A., Tenditnik M.V., Amstislavskaya T.G. Anthocyanins in wheat grain: genetic control, health benefit and bread-making quality // *Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: Proc. Fifth International Scientific Conference PlantGen2019*. Novosibirsk, 2019.
<https://doi.org/10.18699/ICG-PlantGen2019-02>
21. Holton T.A., Cornish E.C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis // *Plant Cell*. 1995. V. 7. P. 1071.
<https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1071>
22. Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids // *Plant J.* 2008. V. 54. P. 733.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
23. Zhao J. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom // *Trends Plant Sci.* 2015. V. 20. P. 576.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.007>
24. Gu K.-D., Wang C.-K., Hu D.-G., Hao Y.-J. How do anthocyanins paint our horticultural products? // *Sci. Hortic.* 2019. V. 249. P. 257.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.034>
25. Poustka F., Irani N.G., Feller A., Lu Y., Pourcel L., Frame K., Grotewold G. A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in arabidopsis and contributes to the formation of vacuolar inclusions // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1323.
<https://doi.org/10.1104/pp.107.105064>
26. Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of Petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1274.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.034041>
27. Yin X., Wang T., Zhang M., Zhang Y., Irfan M., Chen L., Zhang L. Role of core structural genes for flavonoid biosynthesis and transcriptional factors in flower color of plants // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2021. V. 35. P. 1214.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1960605>
28. Pelletier M.K., Murrell J.R., Shirley B.W. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in Arabidopsis (further evidence for differential regulation of “early” and “late” genes) // *Plant Physiol.* 1997. V. 113. P. 1437.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1437>
29. Guo N., Han S., Zong M., Wang G., Zheng S., Liu F. Identification and differential expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in leaf color variants of ornamental kale // *BMC genom.* 2019. V. 20. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5910-z>
30. Xu W., Dubos C., Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes // *Trends Plant Sci.* 2015. V. 20. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>
31. Li J., Han G., Sun C., Sui N. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding // *Plant Signal. Behav.* 2019. V. 14:e1613131
<https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1613131>
32. Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar. B., Martin C., Lepiniec L. MYB transcription factors in Arabidopsis // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 573.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
33. Lin-Wang K.L., Bolitho K., Grafton K., Kortstee A., Karunairetnam S., McGhie T.K., Espley R.V., Hellens R.P., Allan A.C. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae // *BMC Plant Biol.* 2010. V. 10. P. 50.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-50>
34. Chen L., Hu B., Qin Y., Hu G., Zhao J. Advance of the negative regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB transcription factors // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 136. P. 178.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.024>
35. Shi L., Chen X., Wang K., Yang M., Chen W., Yang Z., Cao S. MrMYB6 from Chinese bayberry (*Myrica rubra*) negatively regulates anthocyanin and proanthocyanidin accumulation // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 685654.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.685654>
36. Muhammad N., Uddin N., Khali M., Khan U., Ali N., Ali K., Jones D.A. Diverse role of basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor superfamily genes in the fleshy fruit-bearing plant species // *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2023. V. 59. P. 1.
<https://doi.org/10.17221/2/2022-CJGPB>
37. Mishra A.K., Puranik S., Prasad M. Structure and regulatory networks of WD40 protein in plants // *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 21. P. 32.
<https://doi.org/10.1007/s13562-012-0134-1>
38. Liu X., Feng C., Zhang M., Yin X., Xu C., Chen K. The MrWD40-gene of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) interacts with MYB and bHLH to enhance anthocyanin accumulation // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 31. P. 1474.
<https://doi.org/10.1007/s11105-013-0621-0>
39. Strygina K.V., Khlestkina E.K. Structural and functional organization and evolution of the WD40 genes involved in the regulation of flavonoid biosynthesis in the Triticeae tribe // *Russ. J. Genet.* 2019. V. 55. P. 1398.
<https://doi.org/10.1134/S1022795419110152>
40. Liu H., Liu Z., Wu Y., Zheng L., Zhang G. Regulatory mechanisms of anthocyanin biosynthesis in Apple and Pear // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 8441.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168441>
41. Jin S.-W., Rahim M.A., Kim H.-T., Park J.-I., Kang J.-G., Nou I.-S. Molecular analysis of anthocyanin-related genes in ornamental cabbage // *Genome*. 2018. V. 61. P.

111. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0098>
42. Heng S., Wang L., Yang X., Huang H., Chen G., Cui M., Liu M., Lv Q., Wan Z., Shen J., Fu T. Genetic and comparative transcriptome analysis revealed DEGs involved in the purple leaf formation in *Brassica juncea* // Front. Genet. 2020. V. 11. P. 322. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00322>
43. Mazza G., Cacace J.E., Kay C.D. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids // J. AOAC Int. 2004. V. 87. P. 129.
44. Lee J., Durst R. W., Wrolstad R. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study // J. AOAC Int. 2005. V. 88. P. 1269. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>
45. Marpaung A., Tjahjadi K. The analysis of monomeric anthocyanin by pH differential method is not appropriate for certain anthocyanins // Proc. 16th ASEAN Food Conference Outlook and Opportunities of Food Technology and Culinary for Tourism Industry. Samur-Bali, Indonesia, 2019. <https://doi.org/10.5220/0009985400002964>
46. Truong V.-D., Deighton N., Thompson R.T., McFeeters R.F., Dean L.O., Pecota K.V., Yencho G.C. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweet potatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 404. <https://doi.org/10.1021/jf902799a>
47. Saha S., Singh J., Paul A., Sarkar R., Khan Z., Banerjee K. Anthocyanin profiling using UV-vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry // J. AOAC Int. 2020. V. 103. P. 23. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0201>
48. Merzlyak M., Gitelson A., Chivkunova O., Solovchenko A., Pogosyan S. Application of reflectance spectroscopy for analysis of higher plant pigments // Russ. J. Plant Physiol. 2003. V. 50. P. 704. <https://doi.org/10.1023/A:1025608728405>
49. Gitelson A., Solovchenko A. Non-invasive quantification of foliar pigments: possibilities and limitations of reflectance- and absorbance-based approaches // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2018. V. 178. P. 537. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.023>
50. Dymova O.V., Zakhochiy I.G., Golovko T.K. Age and adaptive changes in the photosynthetic apparatus of leaves in winter green herbaceous plant *Ajuga reptans* L. in the natural conditions of the taiga zone // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70. P. 114. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601325>
51. Dooner H.K., Robbins T.P., Jorgensen R.A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis // Annu. Rev. Genet. 1991. V. 25. P. 173. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001133>
52. Li J., Ren L., Gao Z., Jiang M., Liu Y., Zhou L., He J., Chen H. Combined transcriptomic and proteomic analysis constructs a new model for light induced anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. P. 3069. <https://doi.org/10.1111/pce.13074>
53. Song T., Li K., Wu T., Wang Y., Zhang X., Xu X., Yao Y., Han Z. Identification of new regulators through transcriptome analysis that regulate anthocyanin biosynthesis in apple leaves at low temperature // PloS ONE. 2019. V. 14:e0210672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210672>
54. Van den Ende W., El-Esawe S.K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? // Environ. Exp. Bot. 2014. V. 108. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.017>
55. Margalha L., Valerio C., Baena-Gonzalez E. Plant SnRK1 kinases: structure, regulation, and function // AMP-activated Protein Kinase. 2016. V. 107. P. 403. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_17
56. Jezek M., Allan A.C., Jones J.J., Geilfus C.-M. Why do plants blush when they are hungry? // New Phytol. 2023. V. 239. P. 494. <https://doi.org/10.1111/nph.18833>
57. Zhou Z., Zhi T., Liu Y., Chen Y., Ren C. Tyrosine induces anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // Am. J. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 328. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.53045>
58. Zhang N., Qi Y., Zhang H.-J., Wang X., Li H., Shi Y., Guo Y.-D. Genistein: a novel anthocyanin synthesis promoter that directly regulates biosynthetic genes in red cabbage in a light-dependent way // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01804>
59. Karageorgou P., Manetas Y. The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light // Tree Physiol. 2006. V. 26. P. 613. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.5.613>
60. Kariñho-Betancourt E. Plant-herbivore interactions and secondary metabolites of plants: ecological and evolutionary perspectives // Bot Sci. 2018. V. 96. P. 35. <https://doi.org/10.17129/botsci.1860>
61. Manetas Y., Drinia A., Petropoulou Y. High contents of anthocyanins in young leaves are correlated to low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition // Photosynthetica. 2002. V. 40. P. 349. <https://doi.org/10.1023/A:1022614722629>
62. Neill S.O., Gould K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? // Funct. Plant Biol. 2003. V. 30. P. 865. <https://doi.org/10.1071/FP03118>
63. Drumm-Herrel H., Mohr I. Photostability of seedlings differing in their potential to synthesize anthocyanin // Physiol. Plant. 1985. V. 64. P. 60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb01213.x>
64. Neill S.O., Gould K.S., Kilmartin P.A., Mitchell K.A., Markham K.R. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum* // Plant Cell Environ. 2002. V. 25. P. 539. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00837.x>

65. Yu Z.-C., Lin W., Zheng X.-T., Chow W.S., Luo Y.-N., Cai M.-N., Peng C.L. The relationship between anthocyanin accumulation and photoprotection in young leaves of two dominant tree species in subtropical forests in different seasons // *Photosynth. Res.* 2021. V. 149. P. 41.
<https://doi.org/10.1007/s11120-020-00781-4>
66. Hughes N.M., Morley C.B., Smith W.K. The coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in developing leaves of three deciduous tree species // *New Phytol.* 2007. V. 175 P. 675.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02133.x>
67. Solovchenko A.E., Chivkunova O.B. Physiological role of anthocyanin accumulation in common hazel juvenile leaves // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 674.
<https://doi.org/10.1134/S1021443711040157>
68. Zhu H., Zhang T.-J., Zheng J., Huang X.-D., Yu Z.-C., Peng C.-L., Chow W.S. Anthocyanins function as a light attenuator to compensate for insufficient photoprotection mediated by nonphotochemical quenching in young leaves of *Acmena acuminatissima* in winter // *Photosynthetica.* 2018. V. 56. P. 445.
<https://doi.org/10.1007/s11099-017-0740-1>
69. Borek M., Baczek-Kwinta R., Rapacz M. Photosynthetic activity of variegated leaves of *Coleus x hybridus* hort. cultivars characterised by chlorophyll fluorescence techniques // *Photosynthetica.* 2016. V. 54. P. 331.
<https://doi.org/10.1007/s11099-016-0225-7>
70. Trojak M., Skowron E. Role of anthocyanins in high-light stress response // *World Sci. News.* 2017. V. 81. P. 150.
71. Moustaka J., Tanou G., Giannakoula A., Adamakis I.-D.S., Panteris E., Eleftheriou E.P., Moustakas M. Anthocyanin accumulation in poinsettia leaves and its functional role in photo-oxidative stress // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 175. P. 104065
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104065>
72. Nielsen S.L., Simonsen A.-M. Photosynthesis and photoinhibition in two differently coloured varieties of *Oxalis triangularis* – the effect of anthocyanin content // *Photosynthetica.* 2011. V. 49. P. 346.
<https://doi.org/10.1007/s11099-011-0042-y>
73. Шелякин М.А., Захожий И.Г., Табаленкова Г.Н., Дымова О.В., Малышев Р.В., Далькэ И.В., Головки Т.К. Содержание антоцианов, активность антиоксидантной и энергодиссипирующих систем в листьях *Hylotelephium triphyllum* (Нав.) Holub – представителя сем. Толстянковые на Севере // Материалы II Международного симпозиума “Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений” и международной научной школы “Роль активных форм кислорода в жизни растений”. Уфа, 2017. С. 432.
74. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Solovchenko A.E., Naqvi K.R. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 3903.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern230>
75. Pietrini F., Iannelli M.A., Massacci A. Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis // *Plant Cell Environ.* 2002. V. 25. P. 1251.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00917.x>
76. Zhang J., Li S., An H., Zhang X., Zhou B. Integrated transcriptome and metabolome analysis reveals the anthocyanin biosynthesis mechanisms in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves under different light qualities // *Front. Plant Sci.* 2022 V. 13. P. 1073332.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1073332>
77. Singh P., Singh A., Choudhary K.K. Revisiting the role of phenylpropanoids in plant defense against UV-B stress // *Plant Stress.* 2023. V. 7. P. 100143.
<https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100143>
78. Bi X., Zhang J., Chen C., Zhang D., Li P., Ma F. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel // *Food Chem.* 2014. V. 152. P. 205.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.088>
79. Захожий И.Г., Малышев Р.В., Дымова О.В., Табаленкова Г.Н., Головки Т.К. Регуляция метаболизма тепличных растений листового салата (*Lactuca sativa* L.) воздействием УФ радиации // Известия ТСХА. 2017. № 6. С. 42.
80. Renner S.S., Zohner C.M. Trees growing in Eastern North America experience higher autumn solar irradiation than their European relatives, but is nitrogen limitation another factor explaining anthocyanin-red autumn leaves? A comment on Peña-Novas and Marchetti 2021 (<https://doi.org/10.1111/jeb.13903>) // *J. Evol. Biol.* 2022. V. 35. P. 183.
81. Archetti M. Classification of hypotheses for the evolution of autumn colours // *Oikos.* 2009. V. 118. P. 328.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17164.x>
82. Thomas H., Huang L., Young M., Ougham H. Evolution of plant senescence // *BMC Evol. Biol.* 2009. V. 9. P. 163.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-163>
83. Lev-Yadun S., Gould K.S. What do red and yellow autumn leaves signal? // *Bot. Rev.* 2007. V. 73. P. 279.
84. Hoch W.A., Zeldin E.L., McGown B.H. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence // *Tree Physiol.* 2001. V. 21. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/treephys/21.1.1>
85. Yin G., Wang Y., Xiao Y., Yang J., Wang R., Jiang Y., Jiang Y. Relationships between leaf color changes, pigment levels, enzyme activity, photosynthetic fluorescence characteristics and chloroplast ultrastructure of *Liquidambar formosana* Hance // *J. For. Res.* 2022. V. 33. P. 1559.
<https://doi.org/10.1007/s11676-021-01441-6>
86. Hoch W.A., Singaas E.L., McCown B.H. Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. P. 1296.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.027631>

87. George C.O., Hughes N.M., Neufeld H.S. Coevolution and photoprotection as complementary hypotheses for autumn leaf reddening: a nutrient-centered perspective // *New Phytol.* 2022. V. 233. P. 22.
<https://doi.org/10.1111/nph.17735>
88. Mattila H., Tyystjärvi E. Red pigments in autumn leaves of Norway maple do not offer significant photoprotection but coincide with stress symptoms // *Tree Physiol.* 2023. V. 43. P. 751.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpad010>
89. Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection // *New Phytol.* 2002. V. 155. P. 349.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x>
90. Akula R., Ravishankar G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6. P. 1720.
<https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
91. Alkhsabah I.A., Alsharafa K.Y., Kalaji H.M. Effects of abiotic factors on internal homeostasis of *Mentha spicata* leaves // *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2018. V. 16. P. 2537.
https://doi.org/10.15666/aer/1603_25372564
92. Mbarki S., Sytar O., Zivcak M., Abdelly C., Cerda A., Brestic M. Anthocyanins of coloured wheat genotypes in specific response to salt stress // *Molecules.* 2018. V. 23: 1518.
<https://doi.org/10.3390/molecules23071518>
93. Чупахина Г.Н., Масленников П.В. Адаптация растений к нефтяному стрессу // *Экология.* 2004. № 5. С. 330.
94. Бузмаков С.А., Хотяновская Ю.В., Андреев Д.Н., Егорова Д.О., Назаров А.В. Индикация состояния экосистем в условиях нефтепромышленного техногенеза // *Географический вестник.* 2018. Т. 4. С. 90.
95. Lila M.A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach // *J. Biomed. Biotechnol.* 2004. V. 5. P. 306.
<https://doi.org/10.1155/S111072430440401X>
96. Mazza G.J. Anthocyanins and heart health // *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2007. V. 43. P. 369.
97. Pascual-Teresa S., Sanchez-Ballesta M.T. Anthocyanins: from plant to health // *Phytochem. Rev.* 2008. V. 7. P. 281.
<https://doi.org/10.1007/s11101-007-9074-0>
98. Tsuda T. Dietary anthocyanin rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies // *Mol. Nutr. Food Res.* 2012. V. 56. P. 159.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>
99. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronbook, 2013. 310 с.
100. Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Yu., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components // *Vavilov J. Genetics and Breeding.* 2021. V. 25. P. 178.
<https://doi.org/10.18699/VJ21.022>

УДК 581.1

ФУРАНОКУМАРИНЫ ЗОНТИЧНЫХ: ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ, РАЗНООБРАЗИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СИНТЕЗА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ В РАСТЕНИИ И ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

© 2023 г. В. Ю. Штратникова*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова”

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва, Россия

*e-mail: vtosha@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.09.2023 г.

После доработки 05.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Обзор посвящен фуранокумаринам — классу веществ, представляющих собой совмещение пиронного, бензольного и фуранового колец, обладающих системой сопряженных двойных связей (которая в ряде случаев может нарушаться). Эта группа соединений широко изучается в настоящее время благодаря своим фототоксическим и лекарственным свойствам. В работе рассмотрены фуранокумарины естественного происхождения, выявленные в семействе Umbelliferae (Зонтичные), или Apiaceae (Сельдерейные), структурировано их многообразие, описана история исследования, известные к настоящему времени этапы их биосинтеза, а также некоторые примеры их биологической активности в растении, в культуре клеток и при медицинском использовании.

Ключевые слова: биологическая активность, биосинтетические пути, фуранокумарины, Apiaceae, Umbelliferae

DOI: 10.31857/S0015330323600729, **EDN:** CWIPAN

ВВЕДЕНИЕ

Фуранокумариновые соединения — это класс химических веществ естественного происхождения, известный, прежде всего, фототоксичностью ряда своих представителей (бергаптен, псорален, ксантотоксин). Они вызывают ожоги на коже под действием ультрафиолетового излуче-

ния. По химической структуре фуранокумарины представляют собой кумариновое двухкольцевое ядро с присоединенным фурановым кольцом (рис. 1).

Основной пик “моды” на исследования фуранокумаринов пришелся на 1960–70-е гг., когда были открыты большая часть известных ныне структур и установлены их химические свойства. В настоящее время фуранокумарины (бергаптен, псорален, императорин, сфондин, ангелицин и др.) широко исследуют как лекарственные вещества (лечение раковых и кожных заболеваний, использование их антисептических, нейротекторных, остеопротекторных и антиоксидантных свойств).

Монографии и справочники, систематизирующие и классифицирующие сведения о фуранокумариновых соединениях, активно издавали в 1970-х и 1990-х гг. (примеры отечественных справочников — [1–3]). Последняя крупная зарубежная работа, систематизирующая информацию по природным кумариновым соединениям, включая фуранокумарины, опубликована в 2002 г. [4]. С развитием интернета и электронных технологий информация стала собираться в элек-

Сокращения: 4CL — 4-кумарат-коА-лигаза; 5-OH-XS — 5-OH-ксантотоксинсинтаза; AkPT1 — пренилтрансфераза *Angelica keiskei*; AS — ангелицинсинтаза; BMT — бергаптол-О-метилтрансфераза; C2'H — *p*-кумароил-коА-2'гидроксилаза; C4H — циннамат C-4-гидроксилаза; Cox-2 — циклооксигеназа 2; CrPT1 — пренилтрансфераза *Citrus paradisi*; CS — колумбианетинсинтаза; FDA — Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, США; MS — мармезинсинтаза; NF-κB — Nuclear Factor Kappa of activated B cells; P5M — псорален-5-монооксигеназа; PAL — фенилаланинаммиакилаза; PI3/Akt — фосфатидилинозитол-3-киназа; PS — псораленсинтаза; P-UVA — псорален-ультрафиолетовая терапия; TNF — фактор некроза опухоли; U6(8)DT (PT) — диметилаллил дифосфат:умбеллиферон пренилтрансферазы по 6 или 8 положению; XMT — ксантотоксол-О-метилтрансфераза; XS — ксантотоксолсинтаза; ВИЛАР — Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений; БИН РАН — Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН.

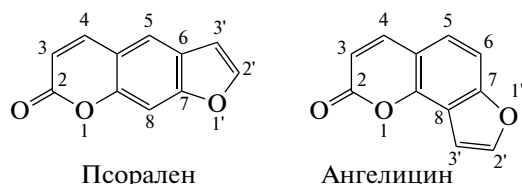


Рис. 1. Базовая структура линейного (псораленовая структура) и углового (ангелициновая или изо-псораленовая структура) фуранокумаринов.

тронные специализированные химические базы. В них включены данные о структурах, спектрах, наименованиях, биологической активности и других свойствах веществ. Однако в избытке информации кроется проблема: исчезает системность, общий взгляд на представленность фуранокумаринов и их многообразие. Существующие базы не дают представления о том, сколько фуранокумариновых структур встречается в природе, какие из них могут синтезироваться растениями самостоятельно, а какие получают только искусственно. Отдельные же обзоры посвящены узким тематикам: конкретным веществам или растениям с лекарственными свойствами. К недавним обзорам, посвященным природным кумаринам (в том числе фуранокумарином), можно отнести обзоры [5, 6], которые содержат много полезной информации о методах выделения фуранокумаринов, их разнообразии и биологической активности, однако они не сосредоточены на привязке фуранокумаринов к таксономическому положению вида.

Наибольшее количество видов растений, у которых обнаружены фуранокумарины, принадлежит к семейству Зонтичных, хотя они встречаются и у других семейств растений. Эта публикация ограничена теми структурами, которые встречаются именно у Зонтичных растений. Одним из представителей семейства Зонтичных является борщевик Сосновского. Это растение отличается очень высокой инвазивностью, выживаемостью и биомассой. Именно фуранокумарины обеспечивают его способность вызывать опасные ожоги на коже. Однако при всей опасности этого растения фуранокумарины, которые в нем содержатся (бергаптен, псорален, ксантотоксин, императорин, пимпинеллин), широко применяются и изучаются в фармацевтике, например, для лечения кожных или нейродегенеративных заболеваний (см. раздел 7). Поэтому борщевик Сосновского может быть не только опасным инвазивным растением, но также и источником лекарственных соединений.

Достижения современных геномных и метаболических технологий позволяют исследовать процесс синтеза фуранокумаринов на геномном уровне (поиск и аннотация генов синтеза в раз-

личных видах). Объем знаний о фуранокумариновых структурах, представленных в определенных таксонах растений, позволяет перейти к вопросам синтеза и связать метаболомные и генетические данные.

Цель обзора – представление исторических и новейших данных о фуранокумариновых естественного происхождения; систематизирование сведений о многообразии структур, синтезирующихся в семействе Umbelliferae, и описание известных к настоящему времени этапов и ферментов их биосинтеза, а также характеристика биологической активности фуранокумаринов и способов их применения в медицине.

1. ИСТОРИЯ И ГЕОГРАФИЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУРАНОКУМАРИНОВ

История изучения фуранокумаринов берет начало еще в XIX в. Первым фуранокумарином, открытым в 1833 г., стал пейцеданин [7], за ним в 1839 г. бергаптен [8]. Первым угловым фуранокумарином, открытым в 1844 г., был атамантин [9] (рис. 2).

До 1930-х гг. исследования фуранокумаринов проводили в немецких лабораториях, и они были посвящены установлению химических свойств и структур этих веществ. С 1930-х гг. к исследованиям фуранокумаринов в лекарственных растениях присоединились японские исследователи. Основной пик изучения фуранокумаринов пришелся на 1960–70-е гг. с развитием методов ЯМР и масс-спектрометрии, позволяющих установить точную структуру вещества. В этот период широкомасштабные исследования проводились в СССР, Индии, Египте, Скандинавии, Канаде, Испании, Франции, Италии, Египте, Иране, Болгарии, США, Польше и Чехословакии. Исследования в Советском Союзе осуществлялись в ВИЛАР, БИН РАН, Харьковском фармацевтическом институте, в институтах Узбекистана и республик Закавказья. В этих странах интерес к теме связан с исследованием растений как источников фармацевтического сырья. В те годы было выпущено множество справочников по фуранокумариновым и справочных публикаций [1, 2] и установлено большинство структур фуранокумаринов.

В 1970–80-е гг. в канадской (работы Steck W., Brown S.A. и др.) и итальянской лабораториях (работы Caporale G., Dall'Aqua F. и др.) (см. ссылки в разделе 5) заложены парадигмальные представления о пути биосинтеза фуранокумаринов: от общего предшественника умбеллиферона через его пренилирование и образование фуранового кольца в деметилсуберозин и остенол, затем через окисление фуранового кольца – к структурам псоралена и ангелицина (раздел 5). Однако, в отличие от многих других путей биосинтеза, про-

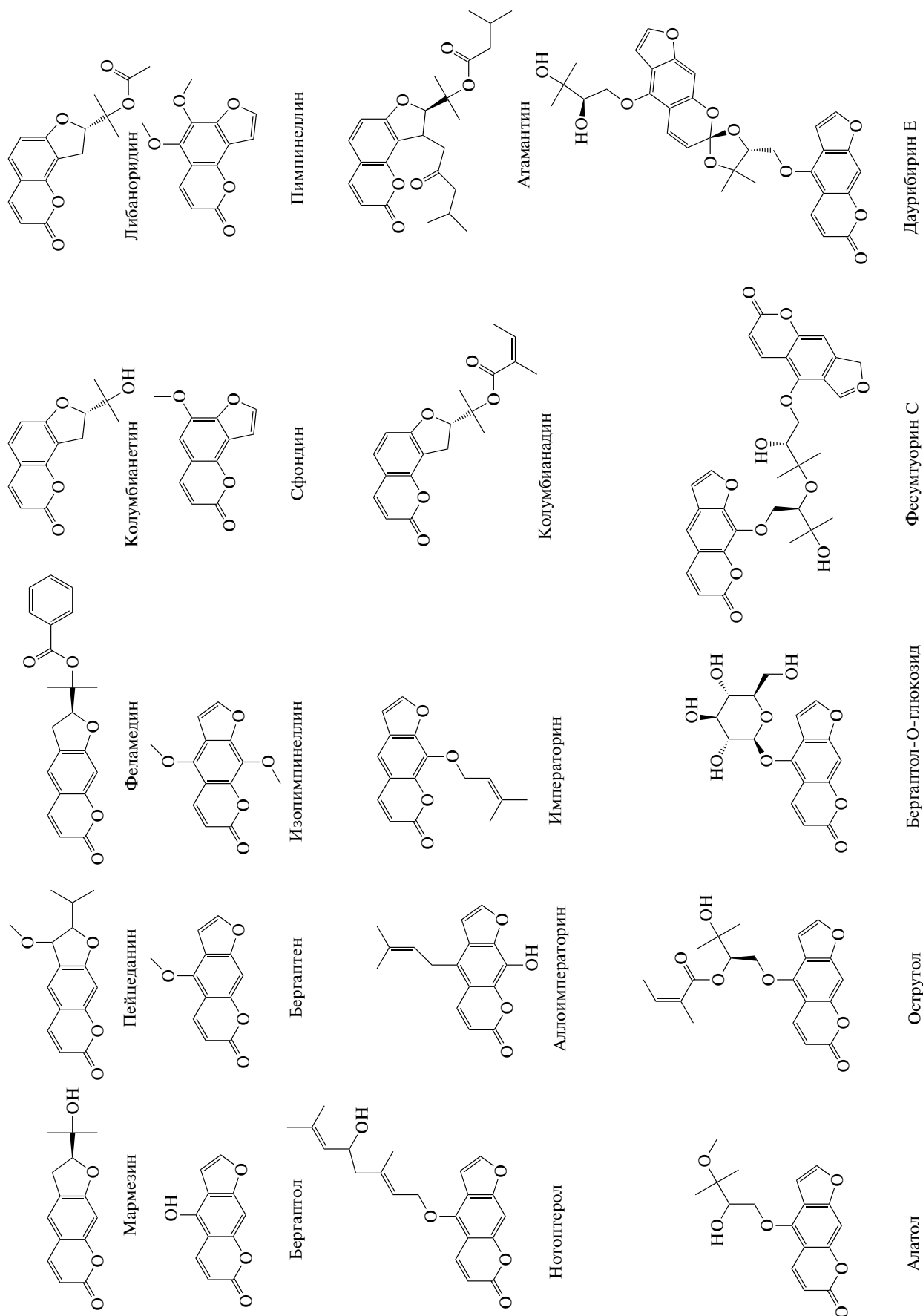


Рис. 2. Примеры фуранокумаринов с различными структурными особенностями.

путь синтеза фуранокумаринов известно довольно мало и имеющаяся информация не объясняет синтеза всего известного многообразия фуранокумаринов.

В XXI в. к исследованиям фуранокумаринов в растениях присоединились Южная Корея (фармацевтические разработки и создания косметических средств), Турция и Иран (эндемичные лекарственные растения). Сейчас лидером в изучении фуранокумаринов является Китай, активно начавший исследования в 1990-х гг.

В настоящее время большинство исследований ведут не в направлении поиска новых структур, а в направлении изучения их химической и биологической активности. Методами системной биологии с применением баз данных и построений нейросетей фуранокумарины исследуют в качестве составляющих лекарственных смесей, рассчитывают мишени их воздействия в организме. Множество исследований посвящено использованию природных фуранокумаринов в фармацевтике (см. раздел 7). В частности, ксантотоксин (methoxalen) зарегистрирован FDA в качестве лекарственного препарата (ANDA 202687). Ряд фуранокумариновых структур запатентован в качестве составляющих лекарственных средств (примеры патентов: бергаптен и псорален [10], ангелицин [11], сфондин [12], императорин [13], бякангелицин [14], оксипейцеданин [15], колумбианадин [16], нотоптерол [17]).

Попытки наладить производство фуранокумаринов в бактериях или дрожжах пока не достигли полного успеха ввиду недостатка знаний о ферментах полного пути их биосинтеза [18], однако удалось создать систему биосинтеза их предшественника умбеллиферона [19].

2. РАЗНООБРАЗИЕ ФУРАНОКУМАРИНОВ

Химически фуранокумарин представляет собой структуру из двух колец, к которой в том или ином положении присоединено фурановое кольцо (рис. 1). В семействе Umbelliferae встречаются фуранокумарины линейные (группа псоралена) и угловые (группа изопсоралена, он же ангелицин). В редких случаях могут встречаться другие типы фуранокумаринов [4], которые здесь, однако, мы не рассматриваем.

Стандартной, всеми принятой и используемой нумерации атомов в молекуле фуранокумаринов не существует; ряд авторов и групп предпочитают использовать нумерацию, отличную от IUPAC. Для целей сравнения структур линейных и угловых фуранокумаринов более наглядной представляется система с отдельной нумерацией фуранового кольца (рис. 1).

Полный список фуранокумариновых структур, выявленных к настоящему времени в семей-

стве Зонтичных, составляет более 400. Одной из задач проводимых нами исследований является создание базы фуранокумаринов с указанием видов, из которых были выделены эти вещества, и отдельного справочника. В данном обзоре будут показаны только некоторые примеры для определенных типов структур с целью отразить основу разнообразия природных фуранокумаринов (рис. 2).

Классифицировать природные фуранокумарины можно по ряду свойств [1, 4].

2.1. Линейная или угловая структура фуранокумаринов. Основами этих базовых структур являются вещества псорален (линейный) и ангелицин (угловой) (рис. 1). В растениях крайне редко встречаются другие варианты прикрепления фуранового кольца, которые здесь не рассматриваются. На рис. 2 примерами угловых фуранокумаринов являются колумбианетин, либаноридин, сфондин, пимпинеллин, колумбианадин, атамантин. Остальные фуранокумарины представляют собой примеры линейных структур (рис. 2).

2.2. Двойная или одинарная (дигидрофуранокумарины) связь между свободными углеродами в фурановом кольце. Эта связь нумеруется как 2'–3' (по другой системе 8–9). В ходе биосинтеза (см. раздел 4) сначала формируются дигидрофуранокумарины, которые затем окисляются до псоралена, ангелицина и их производных. Дигидрофуранокумарины и фуранокумарины могут модифицироваться независимо друг от друга, образуя различные производные. Примеры дигидрофуранокумаринов на рис. 2: мармезин, пейцеданин, феламедин, колумбианетин, либаноридин, колумбианадин, атамантин.

2.3. Количество заместителей в базовой структуре. Если за базовую структуру принять структуру псоралена или ангелицина, то в семействе Umbelliferae могут быть только четыре варианта по количеству заместителей в ней: полное отсутствие (псорален и ангелицин, рис. 1), однозамещенные, двузамещенные и тризамещенные структуры (в других семействах возможно и больше, см. раздел 3.9). Примерами однозамещенной структуры линейных фуранокумаринов являются все вещества, кроме двузамещенных: пейцеданин, аллоимператорин, атамантин (рис. 2). Структуры с тремя заместителями у Зонтичных встречаются редко, и на рис. 2 их примеры не приведены; угловые тризамещенные структуры в этом семействе не обнаружены.

2.4. Положение заместителей в базовой структуре. У зонтичных заместители в фуранокумариновой структуре встречаются только в четырех положениях: 5-, 8- (у угловых структур 6-), 2', 3'. Примерами веществ с заместителями в 5-положении на рис. 2 являются бергаптол, бергаптен, изопимпинеллин, нотоптерол, аллоимператорин, алатол,

острутол, бергаптол-О-глюкозид, пимпинеллин. Вещества с заместителем в 8-положении — изопимпинеллин, аллоимператорин, императорин; в 6-положении — сфондин и пимпинеллин. Дигидроксикумарины свойственны заместители в 2'-положении — мармезин, пейцеданин, феламедин, колумбианетин, либаноридин, колумбианадин. Одиночный заместитель 3' практически не встречается, только в присутствии 2'-заместителя (пейцеданин, атамантин) (рис. 2). В большинстве случаев двузамещенных фуранокумаринов заместители встречаются попарно в положениях 5- и 8-, и 2'- и 3'-. Другие сочетания (например, 5' и 2') обнаруживаются у зонтичных гораздо реже.

2.5. Разнообразие заместителей. Заместители в молекуле фуранокумарина достаточно разнообразны и подчинены определенной системе, обусловленной ходом биосинтеза (см. раздел 5). Непосредственно с фуранокумариновым ядром до появления в боковой цепи первого кислородного атома контактируют три разновидности заместителей: гидроксил, пренил, диметил-оксигруппа. Как у линейных, так и у угловых фуранокумариновых форм с одним гидроксильным обнаруживаются часто (пример — бергаптол) (рис. 2). Дигидроксиформы с одновременным присутствием гидроксильных в положениях 5- и 8- (5- и 6- для угловых) в природе до настоящего времени не выявлены.

Прямое пренилирование фуранокумаринового кольца (без опосредования кислородом) встречается довольно редко (аллоимператорин) (рис. 2), и при этом ни разу не встречается в качестве единственного заместителя; угловых производных такого типа у Зонтичных нет. Пренилированные напрямую структуры чаще представлены в семействе Rutaceae. Модификации прямой пренильной группы крайне редки.

Через диметил-оксигруппу присоединяются заместители в положение 2', такая структура свойственна дигидроксифуранокумарины и обусловлена ходом биосинтеза (см. раздел 4). Примеры на рис. 2: мармезин, колумбианетин. В составе пейцеданина, вероятно, находится уже восстановленная диметил-оксигруппа.

К кислороду гидроксильных упомянутых выше групп могут быть присоединены следующие заместители, примеры которых представлены на рис. 2:

- метильная группа (C1) — наиболее часто выявляемые соединения, встречаются практически у всех видов и в разных семействах (бергаптен, сфондин, изопимпинеллин, пимпинеллин);
- изопренильная группа (C5) с ее модификациями — императорин, колумбианадин, атамантин, алатол, острутол (подраздел 3.6),
- геранильная группа (C10) — встречается у небольшого количества групп растений (пример — нотоптерол, у угловых отсутствует);

— гликозидные группы — в основном, глюкоза (бергаптол-О-глюкозид);

— другие заместители (например, бензоильная группа (феламедин) и ацетильная группа (либаноридин)) — встречаются редко.

Для положений 5, 6 и 8 связь с гидроксильным всегда простая эфирная, для положений 2' и 3' связь с диметил-оксигруппой почти всегда сложнотетраэтерная.

К модифицированной пренильной или геранильной группам присоединяются следующие заместители: гидроксил (оксипейцеданин гидрат) (рис. 3), ацетил, пренил и его модификации (острутол) (рис. 2), иногда — молекулы со следующими вариантами по количеству атомов углерода: C1 (алатол) (рис. 2), C3, C4, C12, C14, C18, полиацетилены (фалькариндиол) и дополнительные глюкозиды. Через простую эфирную связь к пренильной группе присоединяются трет(*tert*)-производные (алатол) (рис. 2). Втор(*sec*)-производные присоединяются через сложно-эфирную связь (C2, C5, гликозиды, пример: острутол) (рис. 2). Для угловых фуранокумаринов подобные структуры (с модификациями пренильной группы) в положениях 5 и 6 не свойственны, но встречаются сложные сочетания групп заместителей в положении 2'.

Заместители более сложных структур с модификациями предыдущих заместителей у Зонтичных практически не встречаются (явления димеризации рассмотрены отдельно).

2.6. Пренильные группы и их модификации. Двойная связь изопреноидной и геранильной цепочек может окисляться и формировать оксид- и эпокси-варианты (изоимператорин, оксипейцеданин, оксипейцеданин гидрат) (рис. 3). Реже возможны оксо-варианты (изооксипейцеданин) (рис. 3). Двойная связь может также восстанавливаться, образуя изовалератные (3-метилбутановые) производные (атамантин) (рис. 2).

Структуры с изопреноидной двойной связью имеют ряд изомеров, которые могут переходить друг в друга. Соответствующие производные называются ангелат (дельтоин), тиглат (шпренгелианин) и сенеционат (пранчимгин) (рис. 3). Ангелат и тиглат трудно различимы при химическом анализе, для их идентификации нужны специальные методики и стандарты. Чаще структуру идентифицируют как ангелат, нежели тиглат.

Изопреноидные производные в двузамещенных структурах возможны в попарных положениях заместителей 5- и 8-, или 2' и 3'. Геранильные производные известны только для однозамещенных структур. Структур с большим количеством элементов в изопренильной цепи (C15 или C20) не обнаружено.

2.7. Олигомеризация фуранокумаринов. По гидроксильным и кислородным группам фураноку-

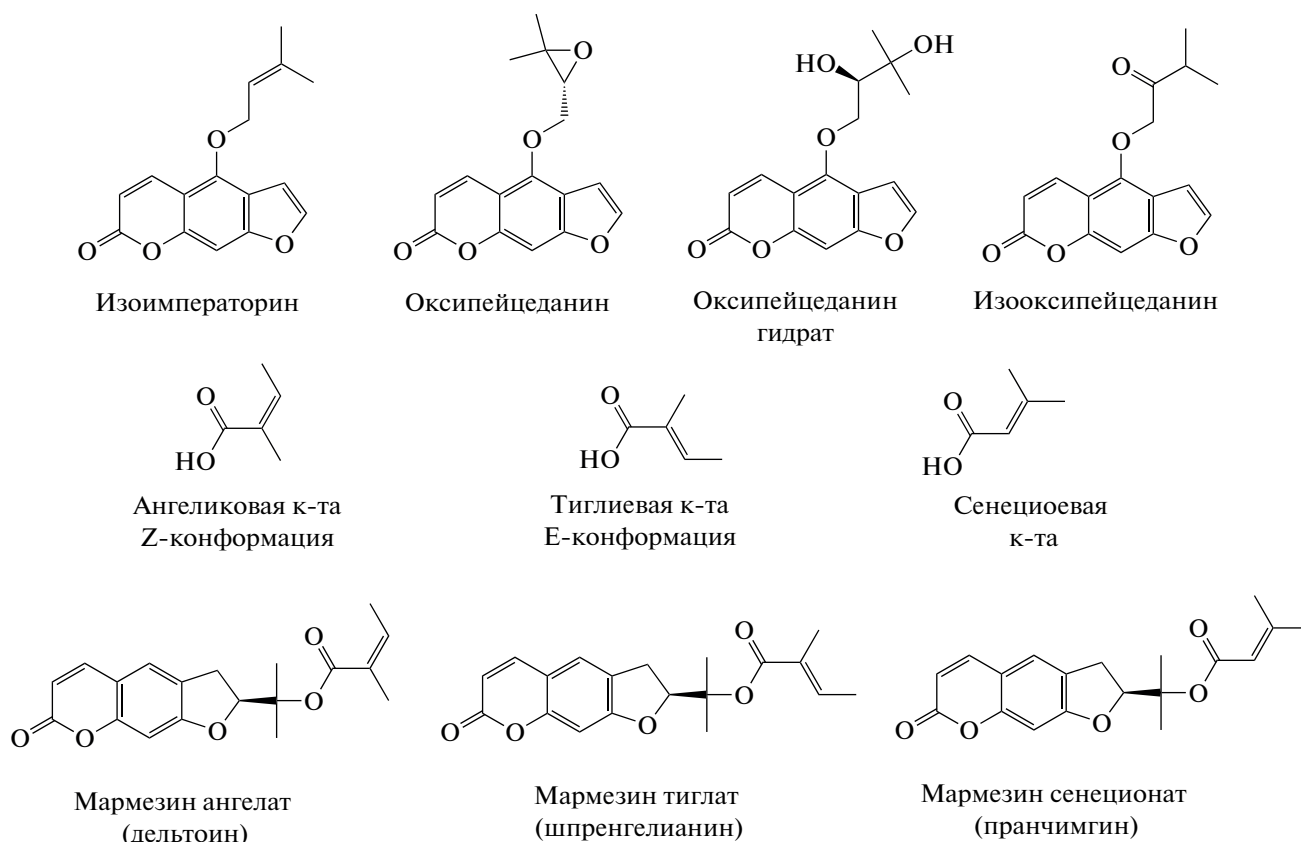


Рис. 3. Модификации и изомерия пренильной связи.

марины могут димеризоваться друг с другом, образуя олигомеры до четырех мономеров в цепочке (бирины, тририны и квадрилины) (примеры двух биринов приведены на рис. 2). При этом димеризация может идти как по гидроксилам изопренильной цепи (фесумтуорин С), так и с участием кето-группы в пирановом кольце (даурибинин Е) (рис. 2). Олигомеризация не обязательно происходит через соединение одинаковых молекул (даурибинин Е: две молекулы оксипейцеданин гидрата), в цепи могут быть и разные структуры (фесумтуорин С: оксипейцеданин гидрат, геракленол). При димеризации возникают новые стереоактивные центры и, таким образом, увеличивается количество энантиомеров. Олигомерные фуранокумарины открыты лишь недавно у небольшого количества видов, для некоторых из них выявлены противовоспалительные свойства [20].

2.8. Основные закономерности в строении фуранокумариновых структур у Зонтичных растений. В семействе зонтичных присутствуют, в основном, следующие структуры: а) 1 или 2-замещенные, б) 5-, 8-, 2- одинарные производные и в) 5- и 8-, 2- и 3- двойные производные. Заместители большей частью соединены с основным скелетом через простую эфирную связь, прямые пренильные радикалы достаточно редки. Гидроксильные

производные базового скелета встречаются значительно реже метил-оксопроизводных. Дигидроксильных 5,8- (5,6) производных в природе не обнаружено. Угловые структуры выявляются реже, чем линейные. Очень мало пренилированных вариантов угловых фуранокумаринов в 5- и 6- положениях. Существует много видов растений, где есть линейные производные, но нет угловых, тогда как обратный вариант встречается крайне редко. Это привело исследователей к мысли, что синтез угловых производных возник в эволюции позже синтеза линейных производных и, возможно, был следствием нарушения механизма синтеза линейных производных [21].

Линейным фуранокумаринам свойственно преобладание 5- и 8-производных, угловым — 2',3'-производных. Многообразие изопренильных производных связано с модификациями боковых цепей, которые характерны для стадий бета-окисления жирных кислот (гидроксилирование, эпексидирование, окисление-восстановление двойных связей). Возможно, в синтезе таких производных также участвуют ферменты окисления жирных кислот.

2.9 Отличия фуранокумаринов семейства Umbelliferae от фуранокумаринов других семейств. Помимо семейства Umbelliferae фуранокумарины

встречаются также и в других семействах растений, например, в семействах Rutaceae, Fabaceae, Moraceae, Asteraceae. В основном они представлены теми же, что и у Зонтичных, основными структурами (5- и 8- замещенными фуранокумарины), однако есть и различия. Так, в семействе Rutaceae ряд структур фуранокумаринов имеют заместители в пирановом кольце (такие структуры полностью отсутствуют у Зонтичных), у цитрусовых широко представлены геранилпроизводные (такие как бергамоттин и нотоптерол) [4]. Кроме того, у Рутовых могут встречаться фуранокумарины с тремя и четырьмя заместителями, а также разнообразные димерные производные, в том числе димеры с кумариновыми структурами. Чаше, чем у Зонтичных, встречаются прямые пренильные производные (у Зонтичных почти все пренильные производные связаны с ядром через кислород). Однако детальная систематизация фуранокумаринов других семейств, кроме Зонтичных, выходит за рамки данного обзора. Обнаружение фуранокумаринов в дальнородственных таксонах предполагает случай конвергентной эволюции в ответ на давление окружающей среды [5]. Участие конкретных ферментов в синтезе различных форм фуранокумаринов и пути синтеза этих форм остаются слабоизученными.

3. ВИДОВАЯ ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ

Наиболее представительной работой (по количеству видов растений), отражающей представленность кумаринов и фуранокумаринов в разных таксономических группах, является справочник, опубликованный в 1971 г. [2]. Данные, приведенные ниже, взяты из этого справочника, а также из предполагаемой к будущей публикации базы автора обзора.

Ко времени написания обзора (июль 2023 г.) фуранокумарины были обнаружены более, чем в 500 видах Зонтичных, объединенных в более чем в 100 родов. Наибольшее разнообразие фуранокумаринов найдено в видах трибы Selineae (172 вида, главным образом, в родах *Angelica*, *Seseli*, *Pseudanum*), за ней Tordyleae (75 видов, в основном, в роде *Heracleum*) и Cachtys (58 видов, по большей части, в родах *Prangos* и *Ferulago*). В трибе Scandiceae (исследован 51 вид, в основном виды рода *Ferula*) выявили мало фуранокумаринов, однако практически везде был обнаружен их предшественник умбеллиферон. Самым изученным растением (по количеству публикаций) является лекарственное растение традиционной китайской медицины *Angelica dahurica*, в котором исследователи определили свыше 120 фуранокумариновых структур.

Почти все исследованные растения семейства Umbelliferae, содержащие фуранокумарины, принадлежат к апиоидной суперкладе. В отдельную

кладу Physospermopsis попадает одно из активно исследуемых лекарственных растений *Notopterygium incisum*, которое отличается большим разнообразием геранилированных производных, отсутствующих в других кладах. Есть также сообщения и о выявлении фуранокумаринов в других кладах [2]. Наиболее исследованными оказались лекарственные и сельскохозяйственные растения: *Angelica dahurica*, *Ammi majus*, *Apium graveolens*, *Cnidium monnieri*, *Pastinaca sativa*, *Notopterygium incisum*, *Petroselinum crispum* и др.

Распределение типов фуранокумаринов в различных видах семейства может отражать организацию их биосинтетических путей и филогению ферментов (для семейства Rutaceae и цитрусовых такая работа уже проделана [22]). Для семейства Зонтичных подобная работа еще только предстоит.

4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОСИНТЕЗА ФУРАНОКУМАРИНОВ

Пути синтеза фуранокумаринов, принимаемые сейчас как основные, установлены в работах канадской (работы Steck W., Brown S.A. и др.) и итальянской лабораториях (работы Caporale G., Dall'Aqua F. и др.) в 1970-80-х гг. (ссылки см. ниже).

4.1. Синтез умбеллиферона

Предшественником фуранокумаринов считается кумарин умбеллиферон. Это вещество синтезируется в шикиматном пути из аминокислоты фенилаланина (рис. 4). Под действием фенилаланинаммияклизы (ФАЛ, или PAL) фенилаланин дезаминируется до коричной кислоты [23, 24]. После этого коричная кислота окисляется циннамат С-4-гидроксилазой (С4Н), образуя пара-кумаровую кислоту с гидроксильной в С4-пара-положении [25, 26]. Затем фермент 4-кумарат-коА-лигаза (4CL) присоединяет к кислотной группе кофермент А [27]. На последней ферментативной стадии фермент р-кумароил-коА-2'гидроксилаза (С2'Н) снова окисляет кольцо, встраивая гидроксил в 2-положение [28–30]. В результате последующей спонтанной перестройки пирановое кольцо замыкается и образуется умбеллиферон (рис. 4). Более подробную детализацию и связь приведенных реакций с другими путями биосинтеза флавоноидов и шикиматного пути можно найти в работах [19, 31].

Гипотеза, согласно которой при образовании фуранокумаринов вначале синтезируется бензофурановое производное, а затем замыкается пирановое кольцо, была опровергнута исследованиями с использованием меченых предшественников [32]. В своей гликозилированной форме (скиммин) умбеллиферон транспортируется в листьях к местам синтеза фуранокумаринов. Здесь он дегликозилируется [33].

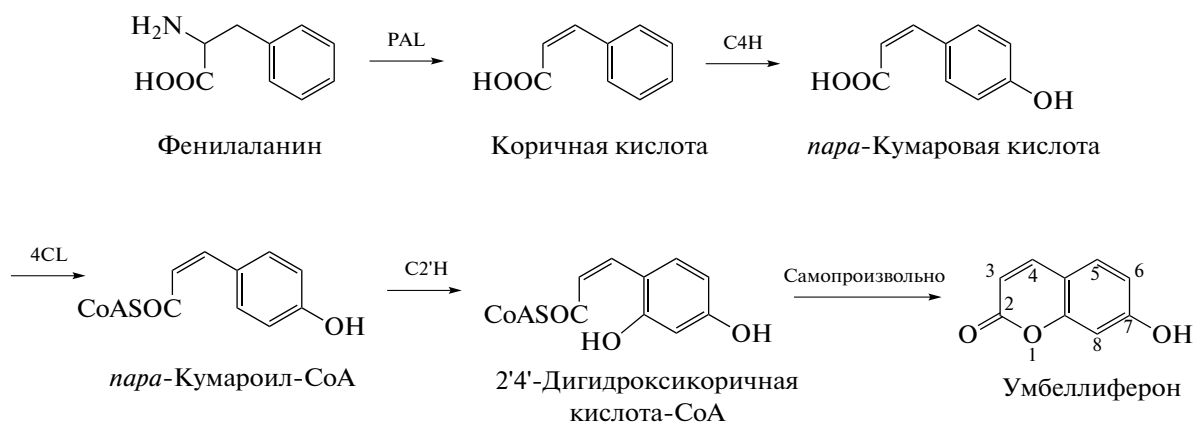


Рис. 4. Синтез умбеллиферона из фенилаланина. PAL – фенилаланинаминиакилаза, C4H – циннамат C-4-гидроксилаза, 4CL – 4-кумарат-коА-лигаза, C2'H – *p*-кумароил-коА-2'гидроксилаза.

4.2. Синтез дигидрофуранокумаринов, углового и линейного базового скелета

Последующий путь синтеза фуранокумаринов разветвляется на путь образования линейной и угловой форм (рис. 5). Этот этап зависит от того, какое именно положение в молекуле умбеллиферона будет пренилировано – 6 или 8 [21, 33]. При пренилировании 6-положения ферментом диметилаллил дифосфат:умбеллиферон пренилтрансферазой (U6DT) образуется кумарин деметилсуберозин, а при пренилировании 8-положения (U8DT) – кумарин остенол [34]. Затем под действием мармезинсинтазы и колумбианетинсинтазы пренильная цепь и гидрокси-группа замыкаются в фурановое кольцо. Образуются мармезин (линейный дигидрофуранокумарин) и колумбианетин (угловой дигидрофуранокумарин) [21, 35]. После этого под действием ферментов псорален- и ангелицинсинтаз фурановое кольцо окисляется и “носовая группа” отщепляется, формируются базовые структуры псоралена и ангелицина [36]. В синтезе псораленовых и ангелициновых структур участвуют (+)-энантиомеры мармезина и колумбианетина [21, 37].

В этой цепи хорошо изучены ферменты U6/8DT [38–42], а также псорален- и ангелицинсинтазы [43–47]. Мармезинсинтаза обнаружена только одна, причем не в семействе Зонтичных, а у *Ficus carica*, и гомологов ее у зонтичных на данный момент не обнаружено [48]. Существование колумбианетинсинтазы же только предполагается [31, 49]. Ферменты, в результате которых образуются 2'- и 3'-производные дигидрофуранокумаринов, неизвестны.

4.3. Модификации базового ядра

Дальнейшая модификация фуранокумаринового скелета происходит за счет гидроксилирований и метоксилирований (рис. 6а) [36, 50].

(Тем не менее, не исключен и путь, в котором сначала гидроксيليруется мармезин и лишь потом синтезируются производные псоралена [51], однако превалирует, по-видимому, описанный далее в этом разделе путь [52]). Вначале осу-

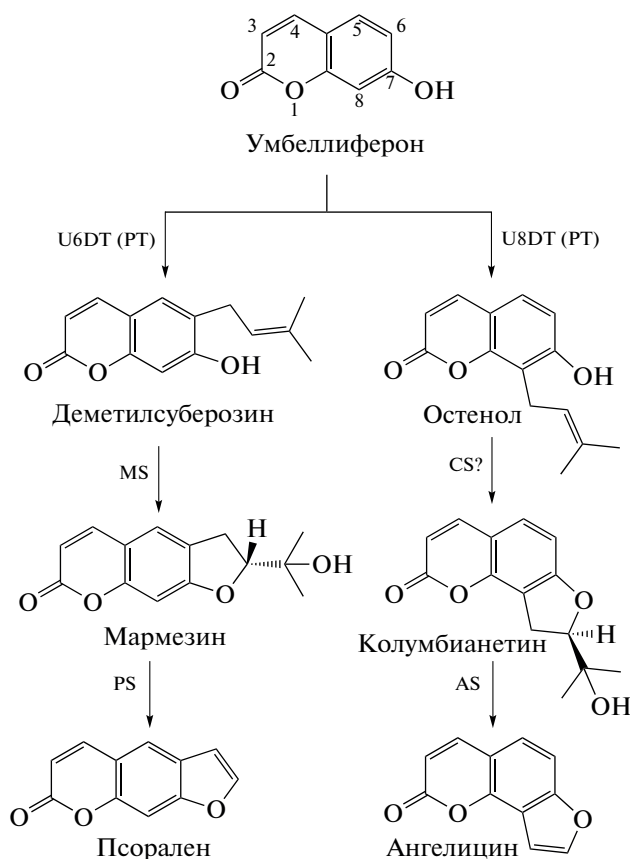


Рис. 5. Синтез псоралена и ангелицина из умбеллиферона. U6(8)DT (PT) – диметилаллил дифосфат:умбеллиферон пренилтрансферазы по 6 или 8 положению, MS – мармезинсинтаза, CS? – колумбианетинсинтаза гипотетическая, PS – псораленсинтаза, AS – ангелицинсинтаза.

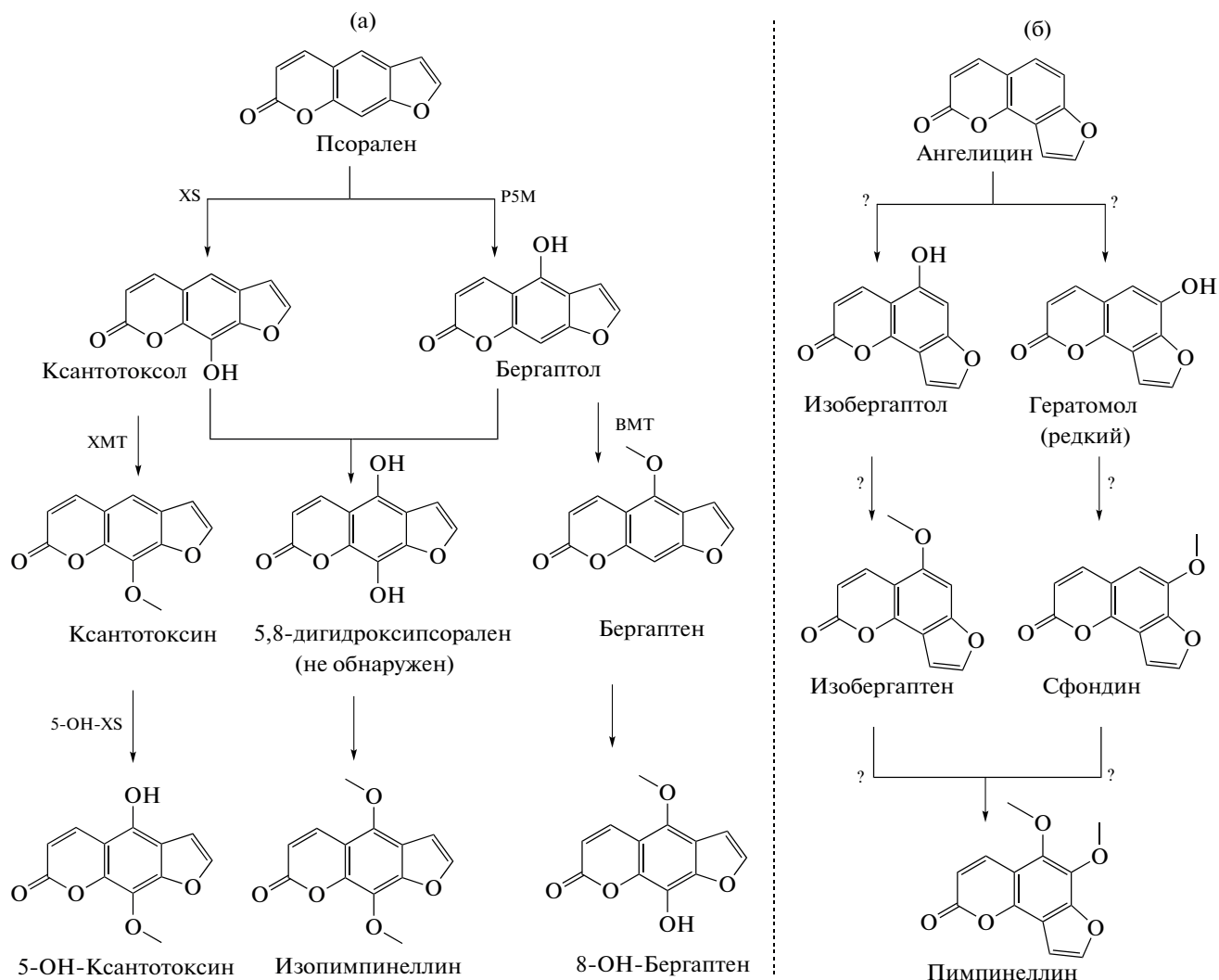


Рис. 6. Гидроксилирование и метоксилирование базового фуранокумаринового ядра. XS – ксантотоксолсинтаза, P5M – псорален-5-монооксигеназа, BMT – бергаптол-О-метилтрансфераза, 5-OH-XS – 5-OH-ксантотоксинсинтаза. XMT – ксантотоксол-О-метилтрансфераза. 5,8-дигидроксипсорален в природе не обнаруживается. а) Синтез линейных метоксилированных производных. б) Синтез угловых метоксилированных производных.

шествуется гидроксилирование псоралена (ксантотоксолсинтаза, XS, и псорален-5-монооксигеназа, P5M) [53, 54]. Известны ферменты, которые метоксилируют гидроксильные производные (бергаптол/ксантотоксол-О-метилтрансфераза, BMT/XMT) [55–60]. После метоксилирования одного из положений (5 или 8) может гидроксилироваться противоположное (8- или 5-), соответственно (известен фермент 5-OH-ксантотоксинсинтаза, 5-OH-XS) [54]. Образующийся гидроксил также может метоксилироваться и синтезироваться изопимпинеллин [50], синтез изопимпинеллина возможен и из 5,8-дигидроксипсоралена [61] (однако последнее вещество в растениях семейства Umbelliferae не обнаруживается). Возможны также процессы деметоксилирования, в результате которых псорален образуется из ксантотоксина или бергаптена [32]. Предполагается

мая схема биосинтеза более многочисленных вариантов (в том числе гипотетических), включая угловые и изопентенильные производные, приводится в работе Сацыперовой и Комиссаренко [62]. Вероятно, подобный путь используется при синтезе производных ангелицина (рис. 6б). Для угловых производных фуранокумаринов неизвестен ни один фермент их биосинтеза. Ранее выдвигалась гипотеза о том, что угловые метоксильные производные могут синтезироваться через формирование фуранового кольца у метоксилированных кумариновых предшественников [63], но, насколько известно, она до сих пор не получила подтверждения.

Пренилированные производные образуются почти всегда через псорален, а не через мармезин [64, 65] или его производные. Но для этих процессов известны лишь отдельные ферменты, которые

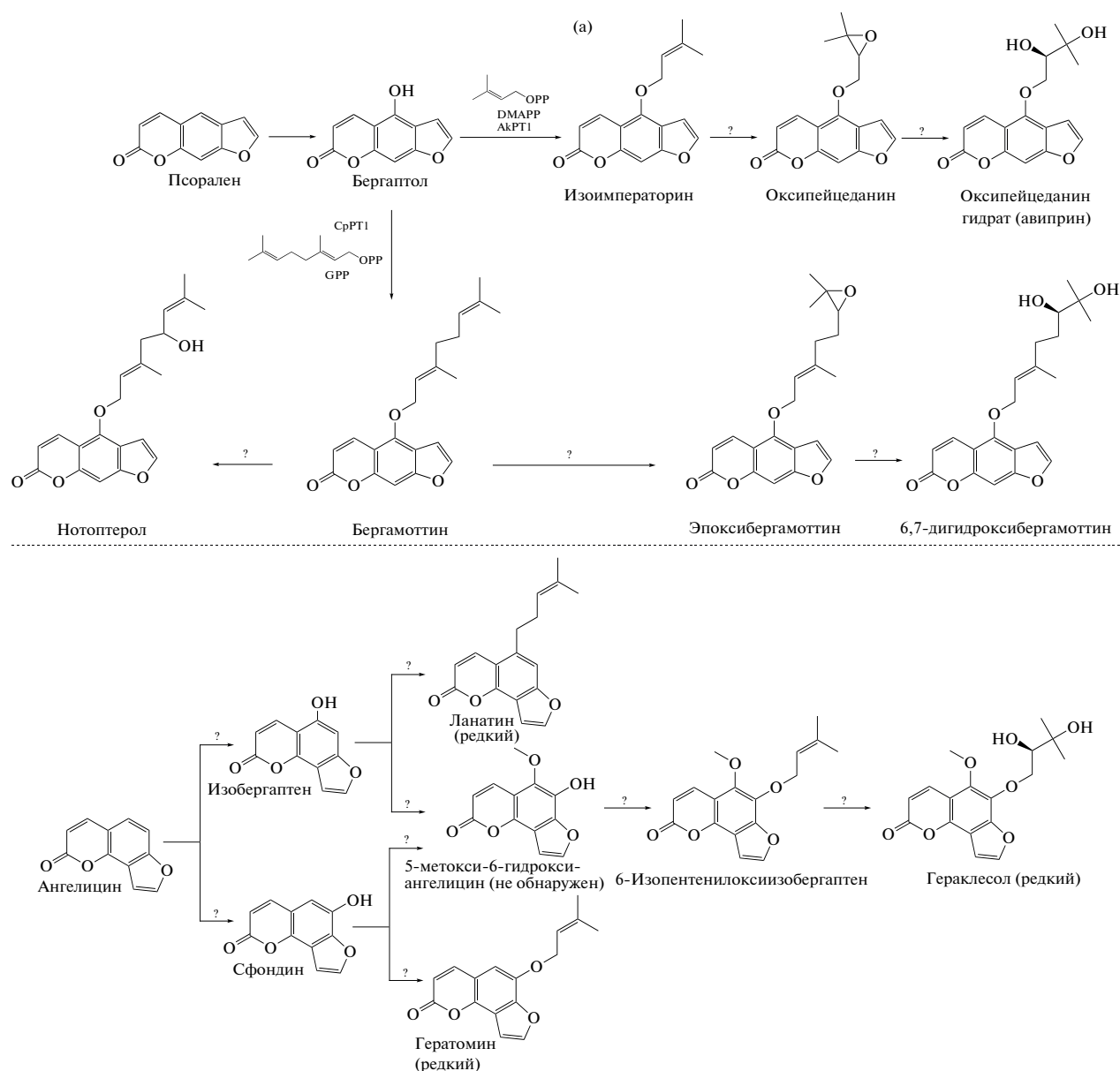


Рис. 7. Образование пренилированных производных фуранокумаринового ядра (гипотетическая схема). а) Образование пренилированных производных линейных фуранокумаринов. Приведен пример только для одного типа производных, с заместителями в 5-положении. Предположительно, производные с 8- и 5,8-заместителями синтезируются по тому же принципу, однако ферменты могут отличаться, поскольку 5- и 8-положения фуранокумаринового ядра не полностью идентичны. AkPT1 – пренилтрансфераза *Angelica keiskei*, CrPT1 – пренилтрансфераза *Citrus paradisi* [66]. б) Образование пренилированных производных линейных фуранокумаринов. 5-метокси-6-гидроксиангелицин на данный момент в природе не обнаружен, но может быть гипотетическим посредником в биосинтезе. 6-метокси-5-изопренильных производных у Зонтичных не выявлено.

осуществляют пренилирование и геранилирование молекулы [66] (рис. 7а). Путь биосинтеза пренилированных производных ангелицина, отраженный на рисунке 7б, является гипотетическим.

Других ферментов биосинтеза фуранокумаринов на сегодняшний день не выявлено. Можно предположить, что их поиск следует проводить в семействе р450-цитохромов, поскольку не менее четырех доказанных реакций синтеза фураноку-

маринов осуществляются с помощью р450-цитохромов: C4H, MS, PS, XS [31].

5. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФУРАНОКУМАРИНОВ В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ

Кумариновые и фуранокумариновые соединения способны флуоресцировать и могут быть обнаружены под люминесцентным микроскопом.

Эта методика обнаружения кумаринов и фуранокумаринов применялась с 1960-х гг. для изучения локализации фуранокумаринов в различных органах и тканях растений. Фуранокумарины обнаруживали как в надземных, так и в подземных частях растений: листьях, плодах, корнях. При этом фуранокумарины различались по химическому составу и имели тканеспецифическую локализацию.

В работах Денисовой с соавт. [67–69] для трех растений семейства Зонтичных – *Archangelica decurrens*, *Hippomarathrum microcarpos* (в источнике *microcarpum*), *Seseli campestre* – показано присутствие фуранокумаринов в секреторных каналах плода вокруг зародыша (сеть параэндокарпных каналов), в кутикуле, в одревесневших стенках сосудисто-волокнистых пучков, а также в секреторных каналах корня. При этом состав фуранокумаринов в плодах и корнях был различен.

Флуоресценцию фуранокумаринов также наблюдали в проводящих масляных каналах, связанных с сосудистыми пучками черешков *Heraclium lanatum* [70]. В этой работе было показано, что фуранокумарины не транспортируются по флоэме в листьях, поскольку питающаяся соком растений тля не содержит фуранокумаринов, как и выделяемая тлей жидкость. С помощью иммуногистохимических экспериментов подтверждено присутствие ферментов синтеза фуранокумаринов (PAL и BMT) в эпидермальных клетках и эпителиальных клетках масляных канальцев, при этом BMT экспрессировалась в масляных канальцах в течение всего времени жизни растения [71].

Фуранокумарины обнаруживали на поверхности листьев, в эпикуткулярных восках и на сухих плодах [72, 73]. Подтверждено присутствие фуранокумаринов на поверхности зародыша и в длинных каналах плодов борщевиков *H. lanatum* и *H. mantegazzianum*. На плодах *Angelica archangelica* продемонстрировано, что чем больше размер и степень зрелости зародыша, тем ниже содержание фуранокумаринов в плодах [74]. При этом в семенах, где отсутствовали зародыши, фуранокумарины не были обнаружены [72], тогда как на поверхности и в тканях зародыши содержали фуранокумарины всегда [73]. Ткани плода имели меньше фуранокумаринов, чем семена и поверхность (внутренний интегумент плодовой оболочки). Каллусные культуры *Pastinaca sativa* и *Daucus carota* выделяли фуранокумарины на поверхность каллусных клеток, в суспензионных культурах их образовывалось больше на два порядка, чем на твердом агаре [75].

У *Heraclium sosnowsky* фуранокумарины локализованы большей частью на поверхности трихом и других эпидермальных клеток, а также в клетках субэпидермиса. Подобная локализация обуславливает быстрые фотохимические ожоги

при прикосновении к поверхности покрытых трихомами органов борщевика Сосновского [76].

Недавние исследования, в которых наряду с люминесцентными методами используются также масс-спектрометрические, продемонстрировали наличие в корнях *Angelica dahurica* около 40 фуранокумариновых компонентов. Показано, что содержание фуранокумаринов в главном корне выше, чем в боковых. Отмечено наличие фуранокумаринов в перидерме, коре и флоэме главного корня, а в боковых корнях – только во флоэме [77].

Таким образом, фуранокумарины локализируются, в основном, на поверхности надземных органов или в секреторных каналах, окружающих семена, сосудистых тканях корней и черешков. Ферменты их синтеза, по-видимому, расположены там же [71]. Подобная локализация синтеза (на поверхностях органов и в секреторных вместилищах) свидетельствует о защитной функции фуранокумаринов в организме растения.

Дальний и ближний транспорт внутри растения, а также внутриклеточный транспорт фуранокумаринов на данный момент практически не изучен. Существование внутриклеточного транспорта фуранокумаринов подтверждается тем, что ферменты синтеза фуранокумаринов обнаруживаются в различных компартментах клетки. Так, псораленсинтаза локализуется в эндоплазматическом ретикулуле [53], пренил-трансферазы – в пластидах [39–41], BMT обнаруживалась в цитозоле [58].

6. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

6.1. Роль фуранокумаринов в растениях

С большой степенью вероятности фуранокумарины играют в растениях защитную роль, на что указывает также их выделение на поверхность эпидермиса и в секреторные вместилища. Наиболее известное свойство фуранокумаринов (фототоксичность), вероятно, также служит для защитных целей.

6.1.1. Фототоксичность. Возбужденные ультрафиолетом (320–400 нм) фуранокумарины образуют моноаддукты с пиримидиновыми основаниями ДНК (со стороны фуранового или пиренового кольца). Они связываются с ДНК водородными связями и связями Ван-дер-Ваальса, наиболее реактивны 5'-ТрА-3'-последовательности. Моноаддукты со стороны фуранового кольца могут быть повторно возбуждены вторым УФ-фотоном, в результате чего линейные фуранокумарины образуют межнитевые кросс-связи. Действие псоралена усиливается под влиянием УФ, что проявляется с задержкой в 20–72 ч. Цитотоксичность высока у псоралена, бергаптена и ксантотоксина. При этом под действием УФ уровень их фототоксичности изменяется в разной степени.

У двузамещенного (изопимпинеллина), геранилированного (бергамоттина) или угловых фуранокумаринов фототоксичность значительно понижается. Угловые фуранокумарины или не обладают фототоксическими свойствами, или не образуют интернитевые связи, только моноаддукты [78, 79].

Нарушение структуры ДНК приводит к нарушениям ее репликации и появлению мутаций, в ряде случаев — к развитию опухолей. Возбужденные состояния фуранокумаринов передают энергию кислороду, при этом могут образовываться синглетный кислород и супероксид-анион радикал [80]. Активные формы кислорода способны повреждать ядра, органеллы, мембраны и ферменты эпидермальных, дермальных и эндотелиальных клеток животных. Образование липидных пероксидов мембран, псорален-белковых аддуктов и фотоповреждения мембран клеток предполагаются дополнительными причинами фототоксичности [81]. Следствием действия фуранокумаринов являются серьезные ожоги и повреждения кожи [82, 83].

6.1.2. Антимикробные, фунгицидные и антивирусные свойства. Простыми в постановке и не требующими высокотехнологичного оборудования являются эксперименты, выявляющие антибактериальные и антимикробные, а также фунгицидные свойства фуранокумаринов. Поэтому после фото- и цитотоксичности это одни из наиболее известных их свойств, которые стали изучать с 1950-х гг. — с момента открытия ряда фуранокумариновых веществ. В качестве примера можно привести массовое исследование: 33 кумариновых и фуранокумариновых соединения против семи бактериальных, грибных и вирусных штаммов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Microsporum lanosum*, *Candida albicans*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*) [84], при этом 14 соединений показали антимикробную активность. Продемонстрирована активность феллоптерина против семи бактериальных и грибных штаммов, включая *E. coli* [85], ксантотоксина, бергаптена, изопимпинеллина против *S. aureus* и *Candida albicans* [86], пранчимгина — против *C. albicans* [87].

Как в составе растительных экстрактов, так и выделенные в чистом виде фуранокумарины обладают и антивирусными свойствами. Так, императорин действовал против вируса герпеса HSV-1 [88], оксипейцеданин подавлял репликацию вирусов гриппа H1N1 и H9N2 [89], а псорален и ангелицин подавляли репликацию гамма-гепсеровирусов MHV-68, EBV и KSHV [90]. Возможно, фуранокумарины являются частью антивирусного иммунитета растений, однако такие исследования в отношении растительных вирусов не проводили.

6.1.3. Инсектициды. Присутствие фуранокумаринов в растениях значительно снижает их поедание насекомыми. Такие свойства были показаны для изопимпинеллина, бергаптена, изобергаптена и пимпинеллина, ксантотоксина, псоралена, ангелицина, пейцеданина [91]. Угловые фуранокумарины показали меньший эффект, а метоксильные и безрадикальные фуранокумарины — более сильный, чем фуранокумарины с изопреноидными (C5) заместителями [92]. На примере экологических взаимоотношений различных насекомых и фуранокумарин-содержащих растений *Pastinaca sativa* и *Heracleum*, которые являются их кормовой базой, проведен ряд исследований процессов коэволюции [93–95].

6.1.4. Участие в ответе на стресс и элиситоры. В ответ на поранение корней и листьев *Petroselinum crispum* [96] или при заражении фитофторой почек *P. crispum* [97] вокруг поврежденных участков увеличивалась активность ферментов синтеза фуранокумаринов (PAL, 4CL, BMT) и накапливались фуранокумарины [98]. Сходные явления (накопления фуранокумаринов и увеличение активности их ферментов синтеза) наблюдали в культурах клеток при обработке метилжасмоном (*P. crispum* [99]), дрожжевым экстрактом (*Glehnia littoralis* [100]) и элиситором на основе вытяжки из гриба фитофторы (*Amми majus* [101], *Pso-ralea coryifolia* [102], *P. crispum* [103]). Таким образом, фуранокумарины являются частью защитных реакций растения на повреждение в результате воздействия патогенов.

6.2. Биологическая активность фуранокумаринов для человека. Роль в медицине

Применение фуранокумаринов в медицинских целях — чрезвычайно обширная тематика, на эту тему есть подробные обзоры [5, 104–106]. В этом обзоре мы ограничимся лишь некоторыми примерами.

6.2.1. Лечение кожных заболеваний. С начала их активного исследования в 1950-х гг. фуранокумарины изучаются не только как вещества, наносящие ожоги, но и как лекарственные средства для лечения кожных заболеваний. Одним из первых таких веществ оказался ксантотоксин в лечении псориаза [107] и витилиго [108]. В настоящее время для лечения псориаза используют псорален-УФ терапию (P-UVA), в которой применяют псорален, бергаптен, ксантотоксин и синтетический аналог, не встречающийся в растениях *Umbelliferae*, триоксален (триметилпсорален) [109]. Производные псоралена под действием ультрафиолета стимулировали пролиферацию и дифференцировку меланоцитов [110], ингибируя деление базальных клеток [111]. Это же свойство производных псоралена используется при лечении витилиго [112].

6.2.2. Противоопухолевая активность. Исследования фуранокумаринов как противоопухолевых агентов ведутся уже около 70 лет. В нашей стране они начались еще во второй половине 1940-х гг. в ВИЛАР. В работах группы Никонова [113] было сделано наблюдение, что антимиотически активные препараты содержали карбонильную группу, находящуюся в сопряжении с одной или несколькими двойными связями, в частности, лактоны кумариновой группы, карбонильная группа которых находится в сопряжении с двойной связью пиранового кольца и ароматическим ядром. Это заставило исследователей обратить внимание на группу производных псоралена — фуранокумаринов. Дигидрофуранокумарины действовали при этом слабее, чем дегидрированные производные, вероятно, из-за нарушения сопряженности связей, а вещества с метоксильными радикалами — эффективнее веществ с гидроксильными или алкильными радикалами. В последующих работах той же группы [114] были исследованы 113 видов растений из 18 семейств и показана высокая противоопухолевая активность (на клетках асцитного рака Эрлиха) для экстрактов 75 растений и 11 индивидуальных веществ.

Изучение антимиотических свойств и механизмов цитотоксического действия фуранокумаринов с тех пор значительно расширилось. Наблюдали защитные свойства фуранокумаринов в случаях лейкемии, глиомы, злокачественных опухолей груди, легких, почек, печени, шейки матки, яичников, простаты и др. [106]. Среди механизмов действия — индукция апоптоза, аутофагия [115], нарушения клеточного цикла.

Индукция апоптоза происходит через ряд сигнальных систем клетки и факторов транскрипции, на которые оказывают влияние фуранокумариновые структуры. Так, с развитием раковых и воспалительных процессов связан ядерный фактор каппа (Nuclear Factor of activated B cells, NF- κ B). Фуранокумарины (например, псорален [116]) ингибировали активность этого фактора и последующие негативные процессы, им вызываемые. Фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3/Akt) инактивировали каспазы и другие ферменты апоптоза; фуранокумарины активировали эти ферменты через подавление PI3/Akt-пути (например, ксантотоксин [117]). Фактор p53 подавлял развитие опухолей, нарушая клеточный цикл и стимулируя апоптоз. Фуранокумарины усиливали его экспрессию (например, императорин [118]). Активировались апоптотические каспазы, а клеточный цикл останавливался в фазе G1.

Остановка клеточного цикла — также один из механизмов цитотоксического действия фуранокумаринов. Блокирование может происходить на разных фазах (G2/M, G1/S) [104]. Например,

бергаптен ингибировал циклин B1, что приводило к задержке клеточного цикла на фазе G2/M, а это, в свою очередь, нарушало пролиферацию и вызывало апоптоз [119].

Цитотоксические свойства показаны как для линейных (псорален [120], бергаптен [121], ксантотоксин [122], императорин [123], изоимператорин [124], оксипейцеданин [125]), так и для угловых (ангелицин [126]) фуранокумаринов. При этом ангелицин считается более перспективным в качестве антиракового агента, поскольку не имеет побочных фототоксических и канцерогенных свойств [126].

6.2.3. Канцерогенность. Наряду со свойствами цитотоксичности, фуранокумарины могут быть канцерогенами. Многолетние исследования показали, что через 15–25 лет после PUVA-терапии у пациентов могли развиваться плоскоклеточная карцинома, карцинома базальных клеток и немеланомный рак кожи [127, 128].

6.2.4. Использование в косметических кремах. Поскольку было выявлено, что фуранокумарины влияют на содержание меланина и пролиферацию клеток, его вырабатывающих, их часто добавляли в косметические крема. Императорин и изоимператорин снижали содержание меланина (в клетках меланомы B16) и ингибировали в них экспрессию тирозиназы, поэтому были предложены как агенты для отбеливания кожи [129]. Также подавляют синтез меланина феллоптерин, геракленин, колумбианадин и оксипейцеданин. Псорален, ксантотоксин, изопимпинеллин, геракленол, оксипейцеданин гидрат, бякангелицин и эдултин, наоборот, увеличивают синтез меланина [130]. Поэтому фуранокумарины использовали в косметических кремах и для лечения витилиго [131]. Однако, поскольку они имеют канцерогенную и фототоксическую активность, в ряде азиатских и европейских стран содержание фуранокумаринов в косметических составах не превышает определенного уровня [132, 133]. Предложено также определять их содержание по шести маркерам: бергаптен, бергамоттин, бякангеликол, эпоксибергамоттин, изопимпинеллин и оксипейцеданин [133]. При этом нотоптерол включается в состав косметических композиций [134] как агент, снижающий содержание меланина.

6.2.5. Нейропротекторы. Одной из причин нейродегенеративных заболеваний (болезни Паркинсона и Альцгеймера) является холинергический недостаток в тканях мозга, связанный, в том числе, с переизбытком ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы. В ряде публикаций было показано, что фуранокумарины императорин, оксипейцеданин, бергаптен, псорален способны ингибировать эти ферменты [120, 135–137].

6.2.6. Заменители эстрогенов. Фуранокумарины (8-гидрокси-5-метоксипсорален и аллоизоимператорин) вызывали эстрогенный ответ (индукцию щелочной фосфатазы AP) у клеток с эстрогеновым рецептором ("Ishikawa cell line") [138]. Экспрессия эстрогенового рецептора α (ER α) является маркером рака груди. Бергаптен снижал его экспрессию через убиквитин-протеасомный путь регуляции содержания белков [139]. Ферментативная активность PI-3 киназы в эстроген-зависимых раковых клетках MCF-7 усиливалась под действием эстрадиола; бергаптен ослаблял влияние эстрогена [140].

6.2.7. Антиостеопорозные свойства. Псорален усиливает пролиферацию и дифференциацию остеобластов, ингибирует дифференциацию и активацию остеокластов, снижает воспаление и увеличивает продолжительность жизни хондроцитов при остеоартритах [120]. Сходными свойствами обладает и бергаптен [121]. Геракленин усиливает дифференциацию остеобластов и минерализацию мезенхимальных стволовых клеток [141]. Таким образом, фуранокумарины рассматриваются как возможные лекарственные вещества для лечения костных заболеваний.

6.2.8. Противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства. Ряд фуранокумаринов, в том числе димерные, ингибировали синтез NO, участвующего в процессах воспаления [20, 142]. Фуранокумариновые структуры (активнее всего предшественник угловых фуранокумаринов остенол и 5-замещенный фуранокумарин императорин) ингибировали активность нейтрофилов, приводящую к воспалительным реакциям (высвобождение активных форм кислорода и протеазы эластазы) [143]. Нодакенин ингибировал ферменты синтеза NO, синтеза простагландина E₂, провоспалительных цитокинов и снижал выработку других факторов, влияющих на воспаление [144]. Колумбианетин ингибировал выход гистамина из тучных клеток и снижал уровень интерлейкинов и фактора некроза опухолей TNF- α , экспрессию циклооксигеназы COX-2 [145, 146]. Колумбиандин применяется при лечении остеоартритов [147].

6.2.9. Антиоксидантная активность. Многочисленные работы посвящены антиоксидантной активности фуранокумаринов. Хотя и в довольно высоких концентрациях, фуранокумарины изопимпинеллин, пимпинеллин, бергаптен подавляли перекисное окисление липидов [148, 149]. Оксипейцеданин и оксипейцеданин гидрат, изоимператорин и ксанотоксин также показали антиоксидантную активность, хотя и более слабую, чем активность синтетических антиоксидантов [150]. Оксипейцеданин и императорин снижали высвобождение активных форм кислорода [151]. Антиоксидантная активность показана для аллоизоимператорина и 5-гидрокси-8-меток-

сипсоралена [152]. При этом экстракты растений, из которых выделены конкретные вещества, оказывались более эффективными в подавлении окислительных реакций, чем отдельные вещества [148], т.е. эффект может суммироваться, в том числе с эффектом других соединений нефуранокумариновой природы.

7. ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фуранокумарины представляют собой обширную группу структур, имеющих разнообразную биологическую активность. Несмотря на их широко известную фототоксичность, вещества фуранокумариновой природы могут применяться в медицине для лечения раковых и нейродегенеративных заболеваний, а также кожных и костных болезней. Самыми активными в биологическом плане являются линейные фуранокумарины, имеющие метоксильные заместители. Разнообразие структур фуранокумаринов представляет большое поле для исследования синтетических и метаболомных процессов.

Для семейства Umbelliferae (Apiaceae) сейчас проводится составление подробной базы, которая обеспечит не только список фуранокумаринов, когда-либо обнаруженных в конкретном растении, но и связь метаболомных данных с таксономическим положением растения. В настоящее время появляется все больше и больше геномной информации о различных видах растений, которая отличается недостатком аннотирования. Подобная база поможет объединить таксономические (филогенетические), метаболомные и геномные данные и улучшить аннотацию новых геномов в области ферментов и транскрипционных факторов, вовлеченных в биосинтез фуранокумаринов. Сопоставление наличия выявленных структур веществ в растениях с известными последовательностями геномов и отдельных генов позволит проследить эволюцию ферментов, обнаружить варианты путей биосинтеза в разных таксонах растений. Наиболее перспективными возможностями являются прогностические: возможность определения по геномной аннотации и присутствию определенных ферментов наличия тех или иных веществ в ранее неисследованных видах растений, а по набору веществ – присутствия ранее неизвестных ферментов биосинтеза.

Автор выражает благодарность Логачевой Марии Дмитриевне (ИППИ РАН) за первоначальную идею работы, Пименову Михаилу Георгиевичу (Биологический факультет и Ботанический сад МГУ) за консультации по систематике Зонтичных, Мавриной Полине (ВИЛАР) за помощь в оцифровке полнотекстовых советских публикаций 1950-х гг., Насаеву Шамсутдину за подготовку рисунков.

Работа сделана в рамках государственной темы исследований “Изучение внутри- и межклеточных взаимодействий методами молекулярной и клеточной биологии, физиологии, математики и биоинформатики”, № АААА-А19–119121690043–3 (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецова Г.А. Природные кумарины и фурукумарины. Л.: Наука, 1967. 248 с.
2. Пименов М.Г. Перечень растений — источников кумариновых соединений. Л.: Наука, 1971. 202 с.
3. Malikov V.M., Saidkhodzhaev A.I., Aripov Kh.N. Coumarins: Plants, structure, properties. Chapter I. // Chem. Nat. Compd. 1998. V. 34. P. 202. <https://doi.org/10.1007/BF02249149>
4. Murray R.D.H. Naturally occurring coumarins // Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Eds. W. Herz et al. Vienna: Springer Vienna, 2002. V. 83. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6172-2_1
5. Bruni R., Barreca D., Protti M., Brighenti V., Righetti L., Anceschi L., Mercolini L., Benvenuti S., Gattuso G., Pellati F. Botanical sources, chemistry, analysis, and biological activity of furanocoumarins of pharmaceutical interest // Molecules. 2019. V. 24. P. 2163. <https://doi.org/10.3390/molecules24112163>
6. Sarker S.D., Nahar L. Progress in the chemistry of naturally occurring coumarins // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 106 / Eds. A.D. Kinghorn et al. Springer International Publishing, 2017. V. 106. P. 241. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59542-9_3
7. Schlatter C.H. Ueber Peucedaninum, einen neuen eigenthümlichen Pflanzenstoff aus der Rad. *Peucedani* // Ann. Pharm. 1833. V. 5. P. 201. <https://doi.org/10.1002/jlac.18330050209>
8. Ohme C. Ueber die Zusammensetzung des Bergamottöls // Ann. Pharm. 1839. V. 31. P. 316. <https://doi.org/10.1002/jlac.18390310309>
9. Schnedermann G., Winckler F.L. Ueber das Athamanthin // Ann. Chem. Pharm. 1844. V. 51. P. 315. <https://doi.org/10.1002/jlac.18440510303>
10. Kadyrova F.R., Shamsutdinov M.I., Shakirov T.T., Abubakirov N.K., Usmanov B.Z., Khamidkhodzhaev S.A., Sultanov M.B., Khanov M.T. Photosensitizing agent “psoberan” for treating (vitiligo) leukoderma and nidulate baldness. SU patent 591188, 1978.
11. Zhu C. Chinese medical preparation of psoralen and isopsoralen for treating vitiligo and psoriasis, and its preparation. CN patent 1839922, 2006.
12. Chen J., Huang A., Ren F., Cheng S., Ren J. Application of sphondin as active ingredient in preparing medicine for treating hepatitis B. CN patent 113069445, 2021.
13. Rui Y., Li T., Qiu Y., Chu Z. Application of imperatorin in preparing the medicine for preventing and treating ischemic brain apoplexy. CN patent 1380059, 2002.
14. Sin K.H. Use of byakangelicin and its tertiary-O-methyl derivative for treating cataract. WO patent 9401106, 1994.
15. Yu F. Health product containing oxypeucedanin and application of oxypeucedanin for treating neurosis. CN patent 103948036, 2014.
16. Chang Y., Wang Y., Li J., He J., Pang X., Liu R., Chen S., Liang C. Columbianadin in preparing pharmaceutical drug for treating and preventing rheumatoid arthritis. CN patent 112791082, 2021.
17. Liang Q., Wang Y., Wang Q., Xu H., Shi Q., Wang T., Qi X., Jia Q., Wang Y., Liu Y., Wang X., Xu C., Liu L., Zhang L., Liu S., et al. Small molecule compound for treating rheumatic arthritis and application thereof. CN patent 109091477, 2018.
18. Rodrigues J.L., Gomes D., Rodrigues L.R. Challenges in the heterologous production of furanocoumarins in *Escherichia coli* // Molecules. 2022. V. 27. P. 7230. <https://doi.org/10.3390/molecules27217230>
19. Zhao Y., Jian X., Wu J., Huang W., Huang C., Luo J., Kong L. Elucidation of the biosynthesis pathway and heterologous construction of a sustainable route for producing umbelliferone // J. Biol. Eng. 2019. V. 13. P. 44. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0174-3>
20. Yang W.-Q., Song Y.-L., Zhu Z.-X., Su C., Zhang X., Wang J., Shi S.-P., Tu P.-F. Anti-inflammatory dimeric furanocoumarins from the roots of *Angelica dahurica* // Fitoterapia. 2015. V. 105. P. 187. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.07.006>
21. Stanjek V., Boland W. Biosynthesis of angular furanocoumarins: mechanism and stereochemistry of the oxidative dealkylation of columbianetin to angelicin in *Heracleum mantegazzianum* (Apiaceae) // HCA. 1998. V. 81. P. 1596. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2675\(19980909\)81:9<1596::AID-HLCA1596>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2675(19980909)81:9<1596::AID-HLCA1596>3.0.CO;2-F)
22. Dugrand-Judek A., Olry A., Hehn A., Costantino G., Ollitrault P., Froelicher Y., Bourgaud F. The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches citrus phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0142757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142757>
23. Park J.H., Park N.I., Xu H., Park S.U. Cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase and pyranocoumarin biosynthesis in *Angelica gigas* // J. Nat. Prod. 2010. V. 73. P. 1394. <https://doi.org/10.1021/np1003356>
24. Sui Z., Luo J., Yao R., Huang C., Zhao Y., Kong L. Functional characterization and correlation analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in coumarin biosynthesis from *Peucedanum praeruptorum* Dunn // Phytochemistry. 2019. V. 158. P. 35. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.11.006>

25. Gravot A., Larbat R., Hehn A., Lièvre K., Gontier E., Goergen J.-L., Bourgaud F. Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant—*Ruta graveolens*—exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 422. P. 71.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.12.013>
26. Hübner S., Hehmann M., Schreiner S., Martens S., Lukačič R., Matern U. Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L. // Phytochemistry. 2003. V. 64. P. 445.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00265-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00265-6)
27. Liu T., Yao R., Zhao Y., Xu S., Huang C., Luo J., Kong L. Cloning, functional characterization and site-directed mutagenesis of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) involved in coumarin biosynthesis in *Peucedanum praeruptorum* Dunn // Front. Plant Sci. 2017. V. 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00004>
28. Vialart G., Hehn A., Olry A., Ito K., Krieger C., Larbat R., Paris C., Shimizu B., Sugimoto Y., Mizutani M., Bourgaud F. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants: C2'H involved in umbelliferone synthesis // The Plant J. 2012. V. 70. P. 460.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04879.x>
29. Yao R., Zhao Y., Liu T., Huang C., Xu S., Sui Z., Luo J., Kong L. Identification and functional characterization of a *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase involved in the biosynthesis of coumarin skeleton from *Peucedanum praeruptorum* Dunn // Plant Molecular Biology. 2017. V. 95. P. 199.
<https://doi.org/10.1007/s11103-017-0650-4>
30. Roselli S., Olry A., Vautrin S., Coriton O., Ritchie D., Galati G., Navrot N., Krieger C., Vialart G., Bergès H., Bourgaud F., Hehn A. A bacterial artificial chromosome (BAC) genomic approach reveals partial clustering of the furanocoumarin pathway genes in parsnip // Plant J. 2017. V. 89. P. 1119.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13450>
31. Bourgaud F., Olry A., Hehn A. Recent advances in molecular genetics of furanocoumarin synthesis in higher plants // Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture / Eds. C. Jacob et al. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. P. 363.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0_14
32. Caporale G., Dall'Acqua F., Marciani S., Capozzi A. Studies on the biosynthesis of psoralen and bergapten in the leaves of *Ficus carica* // Z. Naturforsch. B. 1970. V. 25. P. 700.
<https://doi.org/10.1515/znB-1970-0709>
33. Steck W., Brown S.A. Biosynthesis of angular furanocoumarins // Can. J. Biochem. 1970. V. 48. P. 872.
<https://doi.org/10.1139/o70-137>
34. Innocenti G., Dall'Acqua F., Caporale G. Biosynthesis of linear furanocoumarins: further studies on the role of 7-dimethylsuberosin // Atti Ist. Veneto Sci., Lett. Arti, Cl. Sci. Mat. Nat. 1979. V. 137. P. 219.
35. Brown S.A., Steck W. 7-Demethylsuberosin and ostheanol as intermediates in furanocoumarin biosynthesis // Phytochemistry. 1973. V. 12. P. 1315.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80558-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80558-8)
36. Brown S.A., El-Dakhakhny M., Steck W. Biosynthesis of linear furanocoumarins // Can. J. Biochem. 1970. V. 48. P. 863.
<https://doi.org/10.1139/o70-136>
37. Hamerski D., Matern U. Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin into (+)-marmesin and psoralen // Eur. J. Biochem. 1988. V. 171. P. 369.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13800.x>
38. Ellis B.E., Brown S.A. Isolation of dimethylallylpyrophosphate:umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens* // Can. J. Biochem. 1974. V. 52. P. 734.
<https://doi.org/10.1139/o74-104>
39. Karamat F., Olry A., Munakata R., Koeduka T., Sugiyama A., Paris C., Hehn A., Bourgaud F., Yazaki K. A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley // Plant J. 2014. V. 77. P. 627.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12409>
40. Munakata R., Olry A., Karamat F., Courdavault V., Sugiyama A., Date Y., Krieger C., Silie P., Foureau E., Papon N., Grosjean J., Yazaki K., Bourgaud F., Hehn A. Molecular evolution of parsnip (*Pastinaca sativa*) membrane-bound prenyltransferases for linear and/or angular furanocoumarin biosynthesis // New Phytol. 2016. V. 211. P. 332.
<https://doi.org/10.1111/nph.13899>
41. Munakata R., Kitajima S., Nuttens A., Tatsumi K., Takemura T., Ichino T., Galati G., Vautrin S., Bergès H., Grosjean J., Bourgaud F., Sugiyama A., Hehn A., Yazaki K. Convergent evolution of the UbiA prenyltransferase family underlies the independent acquisition of furanocoumarins in plants // New Phytol. 2020. V. 225. P. 2166.
<https://doi.org/10.1111/nph.16277>
42. Han L., Zhang L., He Y., Liao L., Li J., Xu S., Zhao Y., Bian X., Xia Y. Three carbon-/oxygen-prenyltransferases responsible for furanocoumarin synthesis in *Angelica dahurica* // Ind. Crop. Prod. 2023. V. 200. P. 116814.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116814>
43. Larbat R., Kellner S., Specker S., Hehn A., Gontier E., Hans J., Bourgaud F., Matern U. Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 542.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M604762200>
44. Larbat R., Hehn A., Hans J., Schneider S., Jugdé H., Schneider B., Matern U., Bourgaud F. Isolation and functional characterization of CYP71A/J4 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 4776.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807351200>
45. Dueholm B., Krieger C., Drew D., Olry A., Kamo T., Taibureau O., Weitzel C., Bourgaud F., Hehn A., Simonsen H.T. Evolution of substrate recognition sites (SRSs) in cytochromes P450 from Apiaceae exemplified by the CYP71AJ subfamily // BMC Evol. Biol. 2015.

- V. 15. P. 122.
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0396-z>
46. Jian X., Zhao Y., Wang Z., Li S., Li L., Luo J., Kong L. Two CYP71AJ enzymes function as psoralen synthase and angelicin synthase in the biosynthesis of furanocoumarins in *Peucedanum praeruptorum* Dunn // Plant Mol. Biol. 2020. V. 104. P. 327.
<https://doi.org/10.1007/s11103-020-01045-4>
47. Ren H., Yu Y., Xu Y., Zhang X., Tian X., Gao T. GIPSI overexpression accumulates coumarin secondary metabolites in transgenic *Arabidopsis* // Plant Cell Tiss. Organ. 2023. V. 152. P. 539.
<https://doi.org/10.1007/s11240-022-02427-w>
48. Villard C., Munakata R., Kitajima S., Velzen R., Schranz M.E., Larbat R., Hehn A. A new P450 involved in the furanocoumarin pathway underlies a recent case of convergent evolution // New Phytol. 2021. V. 231. P. 1923.
<https://doi.org/10.1111/nph.17458>
49. Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes // Phytochem. Rev. 2006. V. 5. P. 293.
<https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>
50. Brown S.A., Sampathkumar S. The biosynthesis of isopimpinellin // Can. J. Biochem. 1977. V. 55. P. 686.
<https://doi.org/10.1139/o77-099>
51. Caporale G., Innocenti G., Guiotto A., Rodighiero P., Dall'Acqua F. Biogenesis of linear O-alkylfuranocoumarins: A new pathway involving 5-hydroxymarmesin // Phytochemistry. 1981. V. 20. P. 1283.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)80022-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)80022-2)
52. Dall'Acqua F., Capozzi A., Marciani S., Caporale G. Biosynthesis of furocoumarins: further studies on *Ruta graveolens* // Z. Naturforsch. B. 1972. V. 27. P. 813.
<https://doi.org/10.1515/znB-1972-0717>
53. Hamerski D., Matern U. Biosynthesis of psoralens. Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells // FEBS Lett. 1988. V. 239. P. 263.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80930-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80930-X)
54. Krieger C., Roselli S., Kellner-Thielmann S., Galati G., Schneider B., Grosjean J., Olry A., Ritchie D., Matern U., Bourgaud F., Hehn A. The CYP71AZ P450 subfamily: A driving factor for the diversification of coumarin biosynthesis in Apiaceous plants // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 820.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00820>
55. Hehmann M., Lukačín R., Ekiert H., Matern U. Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L.: Cloning of bergaptol O-methyltransferase // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 932.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03995.x>
56. Ishikawa A., Kuma T., Sasaki H., Sasaki N., Ozeki Y., Kobayashi N., Kitamura Y. Constitutive expression of bergaptol O-methyltransferase in *Glehnia littoralis* cell cultures // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 257.
<https://doi.org/10.1007/s00299-008-0631-9>
57. Lo S.-C., Chung P.-E., Wang C.-S. Molecular cloning and functional analysis of bergaptol-O-methyltransferase from *Angelica dahurica* (Bai Zhi) and using it to efficiently produce bergaptol in *E. coli*. // Bot. Stud. 2012. V. 53. P. 197.
58. Zhao Y., Wang N., Zeng Z., Xu S., Huang C., Wang W., Liu T., Luo J., Kong L. Cloning, functional characterization, and catalytic mechanism of a bergaptol O-methyltransferase from *Peucedanum praeruptorum* Dunn // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 722.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00722>
59. Zhao Y., Wang N., Wu H., Zhou Y., Huang C., Luo J., Zeng Z., Kong L. Structure-based tailoring of the first coumarins-specific bergaptol O-methyltransferase to synthesize bergaptol for depigmentation disorder treatment // J. Adv. Res. 2020. V. 21. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.003>
60. Zhang Y., Bai P., Zhuang Y., Liu T. Two O-methyltransferases mediate multiple methylation steps in the biosynthesis of coumarins in *Cnidium monnieri* // J. Nat. Prod. 2022. V. 85. P. 2116.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00410>
61. Innocenti G., Dall'Acqua F., Caporale G. The role of 5,8-dihydroxypsoralen in the biosynthesis of isopimpinellin // Phytochemistry. 1983. V. 22. P. 2207.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80148-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80148-X)
62. Сацыперова И.Ф., Комиссаренко Н.Ф. Хемосистематика рода *Heracleum* L. флоры СССР. Сообщение 3. Секция *Wendia* (Hoffm.) Manden. и *Apiifolia* Manden.; биосинтез кумаринов и эволюция рода // Раст. ресурсы. 1978. Т. 14. С. 482.
63. Floss H.-G., Mothes U. On the biosynthesis of furocoumarins in *Pimpinella magna* // Phytochemistry. 1966. V. 5. P. 161.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85094-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85094-3)
64. Dall'Acqua F., Innocenti G., Caporale G. Biosynthesis of O-alkyl-furocoumarins // Planta Med. 1975. V. 27. P. 343.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1097812>
65. Innocenti G., Dall'Acqua F., Rodighiero P., Caporale G. Biosynthesis of O-alkylfurocoumarins in *Angelica archangelica* // Planta Med. 1978. V. 34. P. 167.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1097429>
66. Munakata R., Olry A., Takemura T., Tatsumi K., Ichino T., Villard C., Kageyama J., Kurata T., Nakayasu M., Jacob F., Koeduka T., Yamamoto H., Moriyoshi E., Matsukawa T., Grosjean J. et al. Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic O-prenyltransferases in plants // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118: e2022294118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2022294118>
67. Денисова Г.А., Драницына Ю.А. Локализация соединений кумаринового ряда в тканях плода и корня *Archangelica decurrens* LDB. // Бот. журн. 1963. Т. 48. С. 1830.
68. Денисова Г.А., Керимов С.Ш. Локализация кумариновых соединений в тканях плода и корня *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) B. Fedtsch. // Раст. ресурсы. 1966. Т. 2. С. 182.
69. Денисова Г.А., Флоря В.Н. Локализация кумариновых соединений в различных органах и тканях *Seseli campestre* Bess. // Раст. ресурсы. 1970. Т. 6. С. 337.
70. Camm E.L., Wat C.-K., Towers G.H.N. An assessment of the roles of furanocoumarins in *Heracleum lanatum* //

- Can. J. Bot. 1976. V. 54. P. 2562.
<https://doi.org/10.1139/b76-275>
71. Jahnen W., Hahlbrock K. Differential regulation and tissue-specific distribution of enzymes of phenylpropanoid pathways in developing parsley seedlings // *Planta*. 1988. V. 173. P. 453.
<https://doi.org/10.1007/BF00958957>
 72. Zobel A., Brown S., Glowinski K. Localization of furanocoumarins in leaves, fruits, and seeds of plants causing contact photodermatitis // *Planta Med.* 1990. V. 56. P. 571.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-961167>
 73. Zobel A., March R.E. Autofluorescence reveals different histological localizations of furanocoumarins in fruit of some Umbelliferae and Leguminosae // *Ann. Bot.* 1993. V. 71. P. 251.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1032>
 74. Zobel A.M., Brown S.A. Furanocoumarin concentrations in fruits and seeds of *Angelica archangelica* // *Environ. Exp. Bot.* 1991. V. 31. P. 447.
[https://doi.org/10.1016/0098-8472\(91\)90043-N](https://doi.org/10.1016/0098-8472(91)90043-N)
 75. Zobel A.M., Brown S.A. Furanocoumarins on the surface of callus cultures from species of the Rutaceae and Umbelliferae // *Can. J. Bot.* 1993. V. 71. P. 966.
<https://doi.org/10.1139/b93-109>
 76. Weryszko-Chmielewska E., Chwil M. Localisation of furanocoumarins in the tissues and on the surface of shoots of *Heracleum sosnowskyi* // *Botany*. 2017. V. 95. P. 1057.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0043>
 77. Gao H., Li Q. Study on the spatial distribution of coumarins in *Angelica dahurica* root by MALDI-TOF-MSI // *Phytochem. Analysis*. 2022. P. 139.
<https://doi.org/10.1002/pca.3186>
 78. Lohr C., Raquet N., Schrenk D. Application of the concept of relative photomutagenic potencies to selected furocoumarins in V79 cells // *Toxicol. in Vitro*. 2010. V. 24. P. 558.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.10.017>
 79. Raquet N., Schrenk D. Relative photomutagenicity of furocoumarins and limettin in the hypoxanthine phosphoribosyl transferase assay in v79 cells // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. V. 22. P. 1639.
<https://doi.org/10.1021/tx9002287>
 80. Pathak M.A., Joshi P.C. Production of active oxygen species ($^1\text{O}_2$ and O_2^-) by psoralens and ultraviolet radiation (320–400 nm) // *BBA-Gen. Subjects*. 1984. V. 798. P. 115.
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90018-7)
 81. Melough M.M., Cho E., Chun O.K. Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks // *Food Chem. Toxicol.* 2018. V. 113. P. 99.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.030>
 82. Rzymiski P., Klimaszczak P., Poniedziałek B., Karczewski J. Health threat associated with Caucasian giant hogweeds: awareness among doctors and general public in Poland // *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2015. V. 34. P. 203.
<https://doi.org/10.3109/15569527.2014.948685>
 83. Siegelmeier B.L., Colegate S.M., Knoppel E.L., Rood K.A., Collett M.G. Wild parsnip (*Pastinaca sativa*)-induced photosensitization // *Toxicol.* 2019. V. 167. P. 60.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2019.06.007>
 84. Вицканова С.А., Рубинчик М.А., Адгина В.В., Исо-симова С.Б., Макаров Л.В., Шипулина Л.Д., Горюнова Л.В. Антимикробная и противовирусная активность некоторых природных кумаринов // *Раст. Ресур.* 1973. V. 9. P. 370.
 85. Oueslati M.H., Guetat A., Bouajila J., Alzahrani A.K., Basha J. *Deverra tortuosa* (Desf.) DC from Saudi Arabia as a new source of marmin and furanocoumarins derivatives with α -glucosidase, antibacterial and cytotoxic activities // *Heliyon*. 2021. V. 7: e06656.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06656>
 86. Golfakhrabadi F., Shams Ardakani M.R., Saeidnia S., Akbarzadeh T., Yousefbeyk F., Jamalifar H., Khanavi M. In vitro antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of coumarins from *Ferulago carduorum* // *Med. Chem. Res.* 2016. V. 25. P. 1623.
<https://doi.org/10.1007/s00044-016-1595-x>
 87. Karakaya S., Şimşek D., Özbek H., Güvenalp Z., Altanlar N., Kazaz C., Kiliç C.S. Antimicrobial activities of extracts and isolated coumarins from the roots of four *Ferulago* species growing in Turkey // *Iran J. Pharm. Res.* 2019. V. 18. P. 1516.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100718>
 88. Rajtar B., Skalicka-Woźniak K., Świątek Ł., Stec A., Boguszevska A., Polz-Dacewicz M. Antiviral effect of compounds derived from *Angelica archangelica* L. on *Herpes simplex virus-1* and *Coxsackievirus B3* infections // *Food Chem. Toxicol.* 2017. V. 109. P. 1026.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.011>
 89. Lee B.W., Ha T.K.Q., Cho H.M., An J.-P., Kim S.K., Kim C.-S., Kim E., Oh W.K. Antiviral activity of furanocoumarins isolated from *Angelica dahurica* against influenza A viruses H1N1 and H9N2 // *J. Ethnopharmacol.* 2020. V. 259. P. 112945.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112945>
 90. Cho H.-J., Jeong S.-G., Park J.-E., Han J.-A., Kang H.-R., Lee D., Song M.J. Antiviral activity of angelicin against gammaherpesviruses // *Antivir. Res.* 2013. V. 100. P. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.009>
 91. Yajima T., Munakata K. Phloroglucinol-type furocoumarins, a group of potent naturally-occurring insect antifeedants // *Agr. Bio. Chem.* 1979. V. 43. P. 1701.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1979.10863698>
 92. Muckensturm B., Duplay D., Robert P.C., Simonis M.T., Kienlen J.-C. Substances antiappétantes pour insectes phytophages présentes dans *Angelica silvestris* et *Heracleum sphondylium* // *Biochem. Syst. Ecol.* 1981. V. 9. P. 289.
[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(81\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0305-1978(81)90010-7)
 93. Berenbaum M.R. Patterns of furanocoumarin production and insect herbivory in a population of wild parsnip (*Pastinaca sativa* L.) // *Oecologia*. 1981. V. 49. P. 236.
<https://doi.org/10.1007/BF00349195>
 94. Ode P.J., Berenbaum M.R., Zangerl A.R., Hardy I.C.W. Host plant, host plant chemistry and the polyembryonic parasitoid *Copidosoma sosares*: indirect effects in a tritrophic interaction // *Oikos*. 2004. V. 104. P. 388.
<https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12323.x>

95. Jogesh T., Stanley M.C., Berenbaum M.R. Evolution of tolerance in an invasive weed after reassociation with its specialist herbivore // J. Evol. Biol. 2014. V. 27. P. 2334.
<https://doi.org/10.1111/jeb.12469>
96. Lois R., Hahlbrock K. Differential wound activation of members of the phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: coa ligase gene families in various organs of parsley plants // Z. Naturforsch. C. 1992. V. 47. P. 90.
<https://doi.org/10.1515/znc-1992-1-216>
97. Schmelzer E., Kruger-Lebus S., Hahlbrock K. Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. // Plant Cell. 1989. V.1. P. 993.
<https://doi.org/10.1105/tpc.1.10.993>
98. Jahnen W., Hahlbrock K. Cellular localization of non-host resistance reactions of parsley (*Petroselinum crispum*) to fungal infection // Planta. 1988. V. 173. P. 197.
<https://doi.org/10.1007/BF00403011>
99. Ellard-Ivey M., Douglas C.J. Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco // Plant Physiol. 1996. V. 112. P. 183.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.1.183>
100. Kitamura Y., Ikenaga T., Ooe Y., Hiraoka N., Mizukami H. Induction of furanocoumarin biosynthesis in *Glehnia littoralis* cell suspension cultures by elicitor treatment // Phytochemistry. 1998. V. 48. P. 113.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00849-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00849-2)
101. Hamerski D., Schmitt D., Matern U. Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarin phytoalexins in elicitor-treated *Ammi majus* cell suspension cultures // Phytochemistry. 1990. V. 29. P. 1131.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85417-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85417-E)
102. Parast B.M., Chetri S.K., Sharma K., Agrawal V. In vitro isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene // Plant Physiol. Bioch. 2011. V. 49. P. 1138.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.017>
103. Wendorff H., Matern U. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+)marmesin into psoralen // Eur. J. Biochem. 1986. V. 161. P. 391.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb10458.x>
104. Sumorek-Wiadro J., Zajac A., Maciejczyk A., Jakubowicz-Gil J. Furanocoumarins in anticancer therapy – For and against // Fitoterapia. 2020. V. 142. P. 104492.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104492>
105. Elkhawaga O.Y., Ellety M.M., Mofty S.O., Ghanem M.S., Mohamed A.O. Review of natural compounds for potential psoriasis treatment // Inflammopharmacology. 2023. V. 31. P. 1183.
<https://doi.org/10.1007/s10787-023-01178-0>
106. Ahmed S., Khan H., Aschner M., Mirzae H., Kupeli Akkol E., Capasso R. Anticancer potential of furanocoumarins: mechanistic and therapeutic aspects // IJMS. 2020. V. 21. P. 5622.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165622>
107. Wasserman G.A., Llewellyn M.W., Ramsay C.A., Haberman H.F. Treatment of psoriasis with orally administered 8-methoxypsoralen and long-wavelength ultraviolet radiation. // Can. Med. Assoc. J. 1978. V. 118. P. 1379
108. Couperus M. Ammoidin (xanthotoxin) in the treatment of vitiligo // Calif. Med. 1954. V. 81. P. 402
109. Almutawa F., Alnomair N., Wang Y., Hamzavi I., Lim H.W. Systematic review of uv-based therapy for psoriasis // Am. J. Clin. Dermatol. 2013. V. 14. P. 87.
<https://doi.org/10.1007/s40257-013-0015-y>
110. Quintão W.D.S.C., Alencar-Silva T., Borin M.D.F., Rezende K.R., Albernaz L.C., Cunha-Filho M., Gratieri T., De Carvalho J.L., Sá-Barreto L.C.L., Gelfuso G.M. Microemulsions incorporating *Brosimum gaudichaudii* extracts as a topical treatment for vitiligo: In vitro stimulation of melanocyte migration and pigmentation // J. Mol. Liq. 2019. V. 294. P. 111685.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111685>
111. Dasari S., Choudhary A., Madke B. Psoriasis: a primer for general physicians // Cureus. 2023.
<https://doi.org/10.7759/cureus.38037>
112. Pang Y., Wu S., He Y., Nian Q., Lei J., Yao Y., Guo J., Zeng J. Plant-derived compounds as promising therapeutics for vitiligo // Front. Pharmacol. 2021. V. 12. P. 685116.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.685116>
113. Никонов Г.К. Фуранокумарины как группа веществ растительного происхождения с противораковой активностью // Труды ВИЛАР. 1959. Т. XI. С. 180.
114. Цетлин А.Л., Никонов Г.К., Шварев И.Ф., Пименов М.Г. К вопросу о противоопухолевой активности природных кумаринов // Раст. Ресурсы. 1965. Т. С. P. 507.
115. De Amicis F., Aquila S., Morelli C., Guido C., Santoro M., Perrotta I., Mauro L., Giordano F., Nigro A., Andò S., Panno M.L. Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells // Mol. Cancer. 2015. V. 14. P. 130.
<https://doi.org/10.1186/s12943-015-0403-4>
116. Wang X., Cheng K., Han Y., Zhang G., Dong J., Cui Y., Yang Z. Effects of psoralen as an anti-tumor agent in human breast cancer MCF-7/ADR cells // Biol. Pharm. Bull. 2016. V. 39. P. 815.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00957>
117. Bartnik M., Sławińska-Brych A., Żurek A., Kandefer-Szerszeń M., Zdzisińska B. 8-methoxypsoralen reduces AKT phosphorylation, induces intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and suppresses cell growth of SK-N-AS neuroblastoma and SW620 metastatic colon cancer cells // J. Ethnopharmacol. 2017. V. 207. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.010>
118. Zheng Y.M., Lu A.X., Shen J.Z., Kwok A.H.Y., Ho W.S. Imperatorin exhibits anticancer activities in human colon cancer cells via the caspase cascade // Oncol. Rep. 2016. V. 35. P. 1995.
<https://doi.org/10.3892/or.2016.4586>
119. Lee Y.M., Wu T.H., Chen S.F., Chung J.G. Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line // Toxicol. in Vitro. 2003. V. 17. P. 279.
[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00014-6)
120. Ren Y., Song X., Tan L., Guo C., Wang M., Liu H., Cao Z., Li Y., Peng C. A review of the pharmacological proper-

- ties of psoralen // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 571535.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.571535>
121. Liang Y., Xie L., Liu K., Cao Y., Dai X., Wang X., Lu J., Zhang X., Li X. Bergapten: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity // *Phytother. Res.* 2021. V. 35. P. 6131.
<https://doi.org/10.1002/ptr.7221>
 122. Wu A., Lu J., Zhong G., Lu L., Qu Y., Zhang C. Xanthotoxin (8-methoxypsoralen): A review of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity // *Phytother. Res.* 2022. V. 36. P. 3805.
<https://doi.org/10.1002/ptr.7577>
 123. Deng M., Xie L., Zhong L., Liao Y., Liu L., Li X. Imperatorin: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics // *Eur. J. Pharmacol.* 2020. V. 879. P. 173124.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173124>
 124. Tong K., Xin C., Chen W. Isoimperatorin induces apoptosis of the SGC-7901 human gastric cancer cell line via the mitochondria-mediated pathway // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. P. 518.
<https://doi.org/10.3892/ol.2016.5387>
 125. Mottaghipisheh J. Oxypeucedanin: chemotaxonomy, isolation, and bioactivities // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1577.
<https://doi.org/10.3390/plants10081577>
 126. Mahendra C.K., Tan L.T.H., Lee W.L., Yap W.H., Puspapajah P., Low L.E., Tang S.Y., Chan K.G., Lee L.H., Goh B.H. Angelicin—a furocoumarin compound with vast biological potential // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 366.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00366>
 127. Nijsten T.E.C., Stern R.S. The increased risk of skin cancer is persistent after discontinuation of psoralen + ultraviolet a: a cohort study // *J. Invest. Dermatol.* 2003. V. 121. P. 252.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12350.x>
 128. Stern R.S. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: A 30-year prospective study // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012. V. 66. P. 553.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.04.004>
 129. Cho Y.H., Kim J.H., Park S.M., Lee B.C., Pyo H.B., Park H.D. New cosmetic agents for skin whitening from *Angelica dahurica* // *J. Cosmet. Sci.* 2006. V. 57. P. 11.
 130. Matsuda H., Hirata N., Kawaguchi Y., Yamazaki M., Naruto S., Shibano M., Taniguchi M., Baba K., Kubo M. Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by Umbelliferae plant extracts and their coumarin constituents // *Biol. Pharm. Bull.* 2005. V. 28. P. 1229.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.1229>
 131. Cardoso C.A.L., Vilegas W., Honda N.K. Rapid determination of furanocoumarins in creams and pomades using SPE and GC // *J. Pharmaceut. Biomed.* 2000. V. 22. P. 203.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00255-1)
 132. Chu C., Liu C., Yang F., Lian L., Li J., Mao H., Yan J. A dual preconcentration method by combining micro matrix solid-phase dispersion extraction with field-enhanced sample injection and micelle to cyclodextrin stacking for sensitive analysis of neutral coumarins // *Electrophoresis*. 2021. V. 42. P. 1102.
<https://doi.org/10.1002/elps.202000273>
 133. Masson J., Liberto E., Beolor J.-C., Brevard H., Bicchi C., Rubiolo P. Oxygenated heterocyclic compounds to differentiate *Citrus* spp. essential oils through metabolomic strategies // *Food Chem.* 2016. V. 206. P. 223.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.057>
 134. Noh H.S., Jin M.H., Lee S.H. Composition comprising notopterol for improving skin condition. KR patent 2017076469, 2017.
 135. Kim D.K., Lim J.P., Yang J.H., Eom D.O., Eun J.S., Leem K.H. Acetylcholinesterase inhibitors from the roots of *Angelica dahurica* // *Arch. Pharm. Res.* 2002. V. 25. P. 856.
<https://doi.org/10.1007/BF02977004>
 136. Karakaya S., Koca M., Sytar O., Duman H. The natural phenolic compounds and their antioxidant and anticholinesterase potential of herb *Leiotulus dasyanthus* (K. Koch) Pimenov & Ostr. // *Nat. Prod. Res.* 2019. V. 34. P. 1303.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1557176>
 137. Kang S.Y., Kim Y.C. Neuroprotective coumarins from the root of *Angelica gigas*: Structure-activity relationships // *Arch. Pharm. Res.* 2007. V. 30. P. 1368.
<https://doi.org/10.1007/BF02977358>
 138. Piao X.L., Yoo H.H., Kim H.Y., Kang T.L., Hwang G.S., Park J.H. Estrogenic activity of furanocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae* // *Arch. Pharm. Res.* 2006. V. 29. P. 741.
<https://doi.org/10.1007/BF02974073>
 139. Panno M.L., Giordano F., Rizza P., Pellegrino M., Zito D., Giordano C., Mauro L., Catalano S., Aquila S., Sisci D., De Amicis F., Vivacqua A., Fuqua S.W.A., Andò S. Bergapten induces ER depletion in breast cancer cells through SMAD4-mediated ubiquitination // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 136. P. 443.
<https://doi.org/10.1007/s10549-012-2282-3>
 140. Panno M., Giordano F., Palma M., Bartella V., Rago V., Maggolini M., Sisci D., Lanzino M., De Amicis F., Ando S. Evidence that bergapten, independently of its photoactivation, enhances p53 gene expression and induces apoptosis in human breast cancer cells // *CCDT*. 2009. V. 9. P. 469.
<https://doi.org/10.2174/156800909788486786>
 141. Shanmugam H., Dharun V.N., Biswal B.K., Chandran S.V., Vairamani M., Selvamurugan N. Osteogenic stimulatory effect of heraclenin purified from bael in mouse mesenchymal stem cells *in vitro* // *Chem. Biol. Interact.* 2019. V. 310. P. 108750.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108750>
 142. Wei W., Wu X.-W., Deng G.-G., Yang X.-W. Anti-inflammatory coumarins with short- and long-chain hydrophobic groups from roots of *Angelica dahurica* cv. *Hangbaizhi* // *Phytochemistry*. 2016. V. 123. P. 58.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.006>
 143. Lee T.-H., Chen Y.-C., Hwang T.-L., Shu C.-W., Sung P.-J., Lim Y.-P., Kuo W.-L., Chen J.-J. New coumarins and anti-inflammatory constituents from the fruits of *Cnidium monnieri* // *IJMS*. 2014. V. 15. P. 9566.
<https://doi.org/10.3390/ijms15069566>
 144. Rim H.-K., Cho W., Sung S.H., Lee K.-T. Nodakenin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory

- responses in macrophage cells by inhibiting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 and nuclear factor- κ B pathways and protects mice from lethal endotoxin shock // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2012. V. 342. P. 654.
<https://doi.org/10.1124/jpet.112.194613>
145. Jeong H.-J., Na H.-J., Kim S.-J., Rim H.-K., Myung N.-Y., Moon P.-D., Han N.-R., Seo J.-U., Kang T.-H., Kim J.-J., Choi Y., Kang I.-C., Hong S.-H., Kim Y.-A., Seo Y.-W., et al. Anti-inflammatory effect of columbianetin on activated human mast cells // Biol. Pharm. Bull. 2009. V. 32. P. 1027.
<https://doi.org/10.1248/bpb.32.1027>
 146. Lu J., Fang K., Wang S., Xiong L., Zhang C., Liu Z., Guan X., Zheng R., Wang G., Zheng J., Wang F. Anti-inflammatory effect of columbianetin on lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells // Mediat. Inflamm. 2018. V. 2018. P. 1.
<https://doi.org/10.1155/2018/9191743>
 147. Chen S., Wang Y., Zhang L., Han Y., Liang C., Wang S., Qi L., Pang X., Li J., Chang Y. Therapeutic effects of columbianadin from *Angelica pubescentis* radix on the progression of collagen-induced rheumatoid arthritis by regulating inflammation and oxidative stress // J. Ethnopharmacol. 2023. V. 316. P. 116727.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116727>
 148. Souri E., Farsam H., Sarkheil P., Ebadi F. Antioxidant activity of some furanocoumarins Isolated from *Hera-cleum persicum* // Pharm. Biol. 2004. V. 42. P. 396.
<https://doi.org/10.1080/13880200490885077>
 149. Karakaya S., Bingol Z., Koca M., Dagoglu S., Pinar N.M., Demirci B., Gulcin I., Brestic M., Sytar O. Identification of non-alkaloid natural compounds of *Angelica purpurascens* (Ave-Lall.) Gilli. (Apiaceae) with cholinesterase and carbonic anhydrase inhibition potential // Saudi Pharm. J. 2020. V. 28. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.11.001>
 150. Naseri M., Monsef-Esfehani H.R., Saeidnia S., Dastan D., Gohari A.R. Antioxidative coumarins from the roots of *Ferulago subvelutina* // Asian J. Chem. 2013. V. 25. P. 1875.
<https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.13208>
 151. Jalilian F., Moieni-Arya M., Hosseinzadeh L., Shokohinia Y. Oxypeucedanin and isoimperatorin extracted from *Prangos ferulacea* (L.) Lindl protect PC12 pheochromocytoma cells from oxidative stress and apoptosis induced by doxorubicin // Res. Pharm. Sci. 2022. V. 17. P. 12.
<https://doi.org/10.4103/1735-5362.329922>
 152. Piao X.L., Park I.H., Baek S.H., Kim H.Y., Park M.K., Park J.H. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelica dahurica* // J. Ethnopharmacol. 2004. V. 93. P. 243.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.054>

УДК 581.192:57.085

ФЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *Dracosephalum charkeviczii*¹

© 2023 г. В. П. Григорчук^а, О. В. Наконечная^а, *, О. В. Грищенко^а, А. Б. Безделев^б

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки
“Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии”
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

^бФилиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки
“Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского”
Дальневосточного отделения Российской академии наук — научно-образовательный комплекс
“Приморский океанариум”, Владивосток, Россия

*e-mail: markelova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Растения рода *Dracosephalum* являются источником биологически активных соединений, в том числе розмариновой кислоты и различных флавоноидов. Их концентрация варьирует в течение вегетационного периода. Для выявления изменения концентраций таких соединений у *Dracosephalum charkeviczii* Prob. — эндемичного (сихотеалинско-южнокурильского) вида, дикорастущие и плантационные растения собирали в трех фенологических стадиях: вегетации, цветения-начала плодоношения и подготовки к отмиранию. Методом ВЭЖХ с УФ- и масс-селективным детектированием в метанольных экстрактах листьев обнаружено 17 компонентов полифенольной природы. Идентифицированы новые вещества для *D. charkeviczii* — гликозид кумаровой кислоты, рутинозид и гликозид кверцетина и кумарилгликозид акацетина. Выявлено, что синтез большинства флавоноидов был максимален в начале вегетационного периода и постепенно снижался к его концу. Концентрация производных кофейной кислоты (хлорогеновая кислота, гликозид розмариновой кислоты и дегидрорабдозиин) возрастала, а суммарная концентрация веществ снижалась к концу вегетации.

Ключевые слова: *Dracosephalum charkeviczii*, вторичные метаболиты, полифенолы, фенология

DOI: 10.31857/S0015330323600870, **EDN:** BFNHUD

ВВЕДЕНИЕ

Растения рода *Dracosephalum* L. (сем. Lamiaceae) использовали в фитомедицинских препаратах уже в средние века [1]. Целительные свойства растений определены наличием в них вторичных метаболитов, таких как, эфирные масла, фенольные кислоты, тритерпеноиды, флавоноиды и их гликозиды [2], биологические свойства которых ученые исследуют в течение многих лет [3]. Например, фенольные кислоты проявляют противовоспалительную, противовирусную, антибактериальную и антиоксидантную активность [4]. Среди них хлорогеновая, кофейная и розмариновая кислоты были ранее идентифицированы у видов рода *Dracosephalum* [5]. Девять метаболитов, производных кофейной кислоты с преобладанием розмариновой кислоты и сальвианоловой кис-

лоты В, выявлены у растений *D. forrestii* *in vitro* [6]. Два последних вещества защищают клетки от повреждений, спровоцированных окислительным стрессом, способствуют химиопрофилактике рака [4]. Эти вещества эффективны при терапии cerebrovasкулярных заболеваний и ревматоидного артрита [7–9].

Сбор лекарственных трав сопряжен с периодом сбора, временем, когда лекарственные свойства максимальны в своем проявлении. Исследования показали, что фенологические состояния влияют на синтез вторичных метаболитов у растений [10–12]. К настоящему времени опубликовано несколько работ, посвященных исследованию качественного состава и количественно содержанию вторичных метаболитов в зависимости от фенологических стадий у представителей рода *Dracosephalum* [13–16]. Подобные исследования для вида *D. charkeviczii* отсутствуют. Ранее у растений *D. charkeviczii* из природной популяции и микро-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600870 для авторизованных пользователей.

растений, полученных *in vitro*, был определен состав полифенолов [17].

Целью настоящего исследования было определение влияния фенологических стадий на концентрацию фенольных соединений у *D. charkeviczii*. Данные о колебаниях синтезов метаболитов в процессе физиологического развития необходимы для разработки программы сбора урожая, предполагающей минимальное нарушение нормального цикла растений в естественной среде обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение профиля полифенолов проведено в Федеральном научном центре биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) (г. Владивосток) в 2021–2023 гг.

В работе использованы листья змееголовника Харкевича (*Dracosephalum charkeviczii* Prob., сем. Lamiaceae). Это многолетнее травянистое растение, короткокорневищный поликарпик [18], сихотеалинско-южнокурильский эндемик [19]. В России вид произрастает в Приморском крае и на о. Кунашир Сахалинской области, а за пределами страны – в приморских районах Японии и Китая [20].

Сбор образцов для исследования. Для выявления изменений синтезов в течение вегетационного периода листья *D. charkeviczii* собирали с растений, произрастающих на частной плантации в три фенологических периода: май (до цветения – вегетация), июль (стадия цветения – начала плодоношения) и октябрь (подготовка к отмиранию). Для проверки гипотезы о существовании различий в накоплении веществ между плантационными растениями и растениями, выросшими в природных популяциях, были исследованы листья, собранные в ненарушенной природной популяции *D. charkeviczii* на полуострове Житкова (о. Русский) в двух фенологических периодах: май (вегетация), июль (стадия цветения – начала плодоношения).

Растворители и стандартные образцы. Ацетонитрил и метанол были приобретены у Merck (Германия). Муравьиную кислоту приобрели у Sigma-Aldrich (Германия). Деионизированную воду готовили с использованием системы очистки воды Milli-Q Simplicity (Millipore, Франция). Стандартные образцы кемпферола, рутина, кофейной и хлорогеновой кислоты были приобретены у Sigma-Aldrich.

Исследование состава вторичных метаболитов. Определение качественного и количественного состава полифенолов проводили в соответствии с методом, описанным ранее [17]. Высушенные и

измельченные образцы листьев экстрагировали 80% (по объему) водным метанолом с использованием ультразвука. Экстракты анализировали методом ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity (Agilent, США), оснащенного детектором с диодной матрицей. Аналитическую колонку Zorbax C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм, Agilent, США) использовали для разделения. В качестве элюентов использовали 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде и ацетонитрил. УФ-спектры в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм использовали для идентификации, хроматограммы для количественного расчета регистрировали при значениях длин волн 265 и 330 нм. Для подтверждения идентификации использовали масс-спектрометрическое детектирование, совместив ВЭЖХ систему с тандемным масс-спектрометром Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, GmbH, Германия). МС-анализы проводили в режиме ионизации электрораспылением и одновременной регистрацией отрицательных и положительных ионов. МС/МС-спектры записывали в автоматическом режиме при напряжении фрагментации 1.0 В. В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Количественное определение вторичных метаболитов проводили методом внешней калибровки с использованием коммерчески доступных стандартных образцов кемпферола (Sigma, Германия) и кофейной кислоты (Sigma, США).

Диаграммы построены на основе средних арифметических значений со стандартной ошибкой. Результаты были обработаны с использованием пакета “Statistica” версии 13.0. Для сравнения независимых групп данных применяли ANOVA с критерием Фишера (LSD), критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метанольные экстракты листьев *D. charkeviczii*, полученные в разные периоды вегетации, были изучены с использованием метода ВЭЖХ-УФ-МС/(МС). Типичная ВЭЖХ-УФ хроматограмма анализа неочищенного экстракта представлена на рис. 1. Семнадцать биологически активных компонентов полифенольной природы были определены и идентифицированы, результаты представлены в табл. 1 (Дополнительные материалы).

Среди основных обнаруженных биологически активных компонентов экстрактов присутствовали те, о которых мы писали ранее [17]. К ним относятся 9 фенилпропаноидов, описанных ранее: кофейная кислота (5), хлорогеновая кислота (3) и два ее изомера (1 и 4), розмарино-

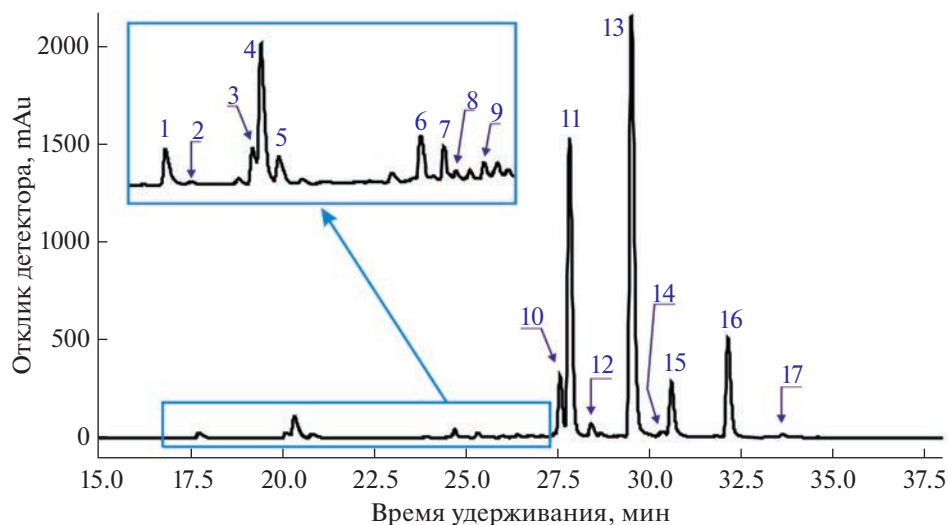


Рис. 1. Типичный хроматографический профиль ВЭЖХ-УФ анализа метанольных экстрактов листьев *Dracocephalum charkeviczii*, зарегистрированный при $\lambda = 330$ нм. Нумерация пиков соответствует представленной в табл. 1 (Дополнительные материалы): 1 – 3-кофеилхинная кислота; 2 – гексозид *n*-кумаровой кислоты; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – 4-кофеилхинная кислота; 5 – кофейная кислота; 6 – кверцетин рутинозид; 7 – кверцетин гексозид; 8 – розмариновой кислоты гексозид; 9 – рабдозин; 10 – акацетин рамнозил-три-гексозид; 11 – розмариновая кислота; 12 – акацетин рамнозил-три-гексозид ацелированный I; 13 – акацетин рамнозил-3-гексозид ацелированный II; 14 – акацетин кумарил-гексозид; 15 – сальвианоловая кислота B; 16 – дегидрорабдозин; 17 – дегидрорабдозин изомер.

вая кислота (11) и ее гликозид (8), рабдозин (9), дегидрорабдозин (16) и сальвианоловая кислота B (15), а также три флавоноида – гликозилированный акацетин (10) и его ацелированные производные (12 и 13) [17]. Дополнительно 5 минорных компонентов были определены и идентифицированы путем сравнения их хроматографического и масс-спектрометрического поведения с литературными данными. Соединения, соответствующие пикам 6 и 7, продемонстрировали схожий УФ-профиль и были предварительно отнесены к классу флавоноидов (рис. 1). Оба соединения характеризовались устойчивыми сигналами как протонированных ионов, так и депротонированных (табл. 1, Дополнительные материалы). Время удерживания, УФ-профиль, а также и МС/МС-спектры молекулярных ионов соединения 6 абсолютно совпали с полученными данными для аутентичного стандартного образца кверцетина рутинозида (рутин). Так, фрагментация протонированных ионов с образованием дочерних ионов с m/z 465 и m/z 303 соответствовала элиминированию остатков дезоксигексозы (–146 Д) и гексозы (–162 Д). Соединение 7 отличалось от соединения 6 на один фрагмент дезоксигексозы (146 Д) и было предположительно определено как кверцетин гексозид. Соединение 14, соответствующее пику со временем удерживания 30.3 мин, характеризовалось УФ-спектром схожим со спектрами производных акацетина (10, 12 и 13). Сравнение масс-спектрометрического профиля соединения 14 с данными, опубликованными ранее [21, 22], позволило идентифицировать его как акацетин-гек-

созид ацилированный кумаровой кислотой. УФ и МС характеристики соединения 17 (33.7 мин) оказались схожи с таковыми для дегидрорабдозина (16) и данное соединение было определено как его изомер. Пик 2 со временем удерживания 18.7 мин имел максимум поглощения 295 нм, что характерно для *n*-кумаровой кислоты [23]. МС/МС² данные соединения 2 полностью соответствовали опубликованным ранее [24, 25] для гексозида кумаровой кислоты.

У двух групп растений, собранных из разных мест обитания, во все периоды сбора максимальные концентрации выявлены для гликозилированного и ацелированного акацетина (13) и розмариновой кислоты (11). Содержание данных соединений было выше в 10 и более раз, по сравнению с другими веществами (рис. 2, 3).

При анализе изменений синтезов веществ у плантационных растений *D. charkeviczii* выявлено изменение концентрации в разные фенологические фазы. Так, синтез трех фенольных кислот: двух кофеилхинных (1 и 4) и кофейной (5) в конце вегетации снижался на 40, 45 и 64% (рис. 3), по сравнению с таковым в начале вегетации. Синтезы рутинозида (6) и гексозида кверцетина (7), так же, как и рабдозина (9), имели ту же тенденцию, при этом последний в пробах к концу вегетации не детектировался. Концентрация ацелилированного акацетина (13) и сальвианоловой кислоты (15) была максимальной в начале вегетации и снижалась к ее завершению в 2 и 6.6 раза соответственно. Концентрация гликози-

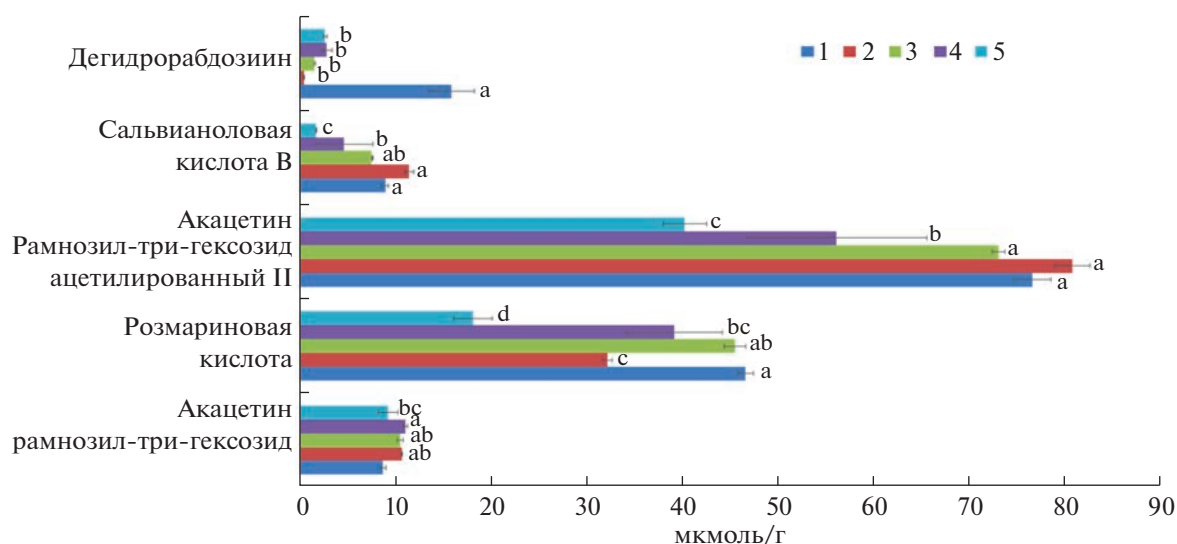


Рис. 2. Диаграмма распределения преобладающих полифенольных соединений в листьях *Dracocephalum charkeviczii* в разные фенологические фазы: 1 и 2 – растения из природной популяции и с плантации до цветения (стадия вегетации), соответственно; 3 и 4 – растения из природной популяции и с плантации в стадии цветения-начала плодоношения; 5 – растения с плантации в стадии зрелого плодоношения и подготовки к отмиранию.

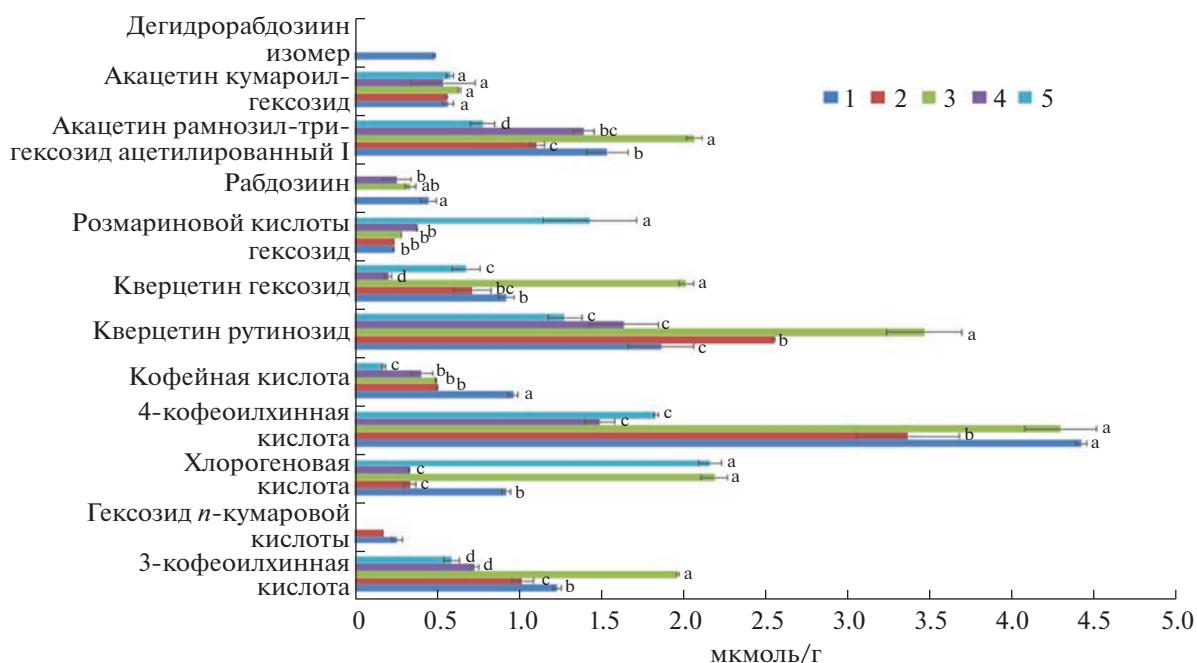


Рис. 3. Диаграмма распределения минорных полифенольных соединений в листьях *Dracocephalum charkeviczii* в разные фенологические фазы. 1 и 2 – растения из природной популяции и с плантации до цветения (стадия вегетации), соответственно; 3 и 4 – растения из природной популяции и с плантации в стадии цветения-начала плодоношения; 5 – растения с плантации в стадии зрелого плодоношения и подготовки к отмиранию.

лированного акацетина (10) менялась незначительно. Синтез розмариновой кислоты (11) так же возрастал в период цветения и снижался к концу вегетации в 2.6 раза. Схожая тенденция отмечена ранее при исследовании *Rosmarinus officinalis* [26]. Показано, что накопление полифенолов (карно-

зола, розмариновой кислоты, карнозиновой кислоты) достигает наивысшего уровня при бутонизации и полном цветении растений.

Синтез хлорогеновой кислоты (3) в листьях *D. charkeviczii* имел противоположную тенденцию, возрастал в 6.4 раза к концу сезона. Для дру-

гого вида рода *Dracocephalum D. kotschyi* отмечено также линейное увеличение содержания для иного класса веществ — метоксифлавоноидов [15]. Авторы его связывают с постепенным повышением температуры во время сезонных изменений, которые считаются благоприятными факторами для синтеза и накопления флавоноидных агликонов.

В нашем исследовании для ацетилгликозилированного акацетина (12) выявлено увеличение синтеза в период цветения с последующим снижением к концу вегетации. Подобная картина ранее отмечена для флавонов, флавонолов и эфирного масла *D. moldavica* [16, 27]. Высокую концентрацию полифенолов (фенольных дитерпенов) у *Rosmarinus officinalis* на ранних стадиях роста листьев авторы связывают с интенсивным клеточным делением, которое происходит в это время [28].

Для *D. charkeviczii* в случае гексозида кверцетина (7) и 4-кофеилхинной кислоты (4), концентрация которых падает в листьях в период цветения (рис. 3), вероятно, происходит отток веществ, предположительно, в другие органы. Аналогичный процесс отмечен для розмариновой кислоты у *Rosmarinus officinalis* [28]. Кривая ее распределения имела максимум на первых стадиях роста листьев, но резко снижалась, когда листья достигали 10–15 мм в длину, вероятно, из-за ее переноса в более молодые листья. В то же время в нашем эксперименте с *D. charkeviczii* мы наблюдали противоположную картину: концентрация розмариновой кислоты (11) была максимальной в период цветения. Это можно объяснить активным формированием листьев при образовании соцветий.

В нашей работе концентрации большинства вторичных метаболитов у растений *D. charkeviczii*, собранных из природной популяции, была выше, чем у растений, собранных с плантации. Дегидрорабдозин (16) в начале вегетации у растений из природной популяции присутствовал в высоких концентрациях, превышая концентрацию у плантационного в 37 раз. К периоду цветения наблюдали резкое падение (в 10 раз) концентрации вещества. Рабдозин (9) в листьях плантационных растений в начале вегетации отсутствует, появляется в середине вегетации и исчезает к ее концу. У природных растений рабдозин присутствует на всех этапах развития. Аналогичные результаты были получены по содержанию эфирного масла в растениях *D. moldavica*, выращенных в полевых условиях (0.37–0.63%), оно было выше по сравнению с выращиванием в теплице (0.17–0.24%) [16].

Более высокие концентрации веществ у растений из природных популяций можно объяснить разницей в условиях произрастания. Плантационный рост сопряжен с меньшими трудностями в получении веществ для развития, чем природ-

ный. Известно, что в стрессовых условиях повышается синтез вторичных метаболитов у растений [29]. Поскольку в природной популяции растения *D. charkeviczii* произрастают на прибрежной территории в условиях засоленности почвы, при воздействии ветра определенной направленности и других негативных факторов, вероятно, для адаптации к условиям обитания повышается накопление вторичных метаболитов [17]. Ранее при изучении варьирования концентраций эфирного масла у *D. moldavica* на разных стадиях роста было показано, что урожайность растений, содержание эфирного масла и состав могут зависеть от стадий роста, а также экологических и климатических условий [27]. Разница в синтезах у растений из разных мест произрастания может быть связана с разными условиями освещения. Так, растения *D. kotschyi* из ксерических районов с высокой интенсивностью освещения имели самое высокое содержание метоксифлавоноидов [30].

На основе наших данных можно предположить, что наибольшая антиоксидантная активность будет в период максимальных концентраций метаболитов в растениях — т.е. в период от цветения до завязывания плодов. Аналогичные выводы представлены ранее для *D. moldavica* [16]. Было доказано, что оптимальное время сбора урожая приходится на стадию цветения, когда содержание эфирного масла самое высокое, следовательно, и количество основных терпенов максимальное. В то же время, обнаружено, что пик содержания вторичных метаболитов у *D. kotschyi* приходится на стадию плодоношения [15]. Сбор растений для лекарственного применения в данный период вегетации не вредит распространению семян и саморазмножению редких растений *D. kotschyi* в естественной среде обитания. Для *D. charkeviczii* такие сборы лучше проводить в конце июня — июле, когда содержание веществ максимальное, как это рекомендовано для *D. moldavica* [16]. Но семена в этот период еще не успевают вызреть и массовая заготовка травы способна привести к сокращению природных популяций. Поскольку растения с плантации не сильно отличаются по концентрации вторичных метаболитов от природных, можно рекомендовать создание плантаций для лекарственного применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно текущему состоянию биотехнологических исследований в пределах рода *Dracocephalum*, с точки зрения продуктивности вторичных метаболитов (в основном полифенолов с сильной антиоксидантной активностью), растения *D. charkeviczii* являются перспективными. Широкое разнообразие биологически активных полифенольных соединений открывает богатые возможности для создания новых препаратов из листьев *D. charkev-*

iczii, заготовленных в начале вегетационного периода до середины июля, когда растения цветут и начинают плодоносить. Сопоставимое содержание веществ у *D. charkeviczii* из природной популяции и плантации позволяет рекомендовать выращивание растений для лекарственного применения в культивируемых условиях, что сохранит природные популяции от уничтожения.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031000144-5).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horn T., Völker J., Rühle M., Häser A., Jürges G., Nick P. Genetic authentication by RFLP versus ARMS? The case of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) // Eur. Food Res. Technol. 2014. V. 238. P. 93.
- Kakasy A., Füzfai Z., Kursinszki L., Molnár-Perl I., Lemerkovics É. Analysis of nonvolatile constituents in *Dracocephalum* species by HPLC and GC-MS // Chromatographia. 2006. V. 63. P. S17. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0741-x>
- Bulgakov V.P., Inyushkina Y.V., Fedoreyev S. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications // Crit. Rev. Biotechnol. 2012. V. 32. P. 203. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.596804>
- Petersen M., Simmonds M.S.J. Rosmarinic acid // Phytochemistry. 2003. V. 62. P. 121. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Zeng Q., Jin H.Z., Quin J.J., Fu J.J., Hu X.J., Liu J.H., Yan L., Chen M., Zhang W.D. Chemical constituents of plants from the genus *Dracocephalum* // Chem Biodivers. 2010. V. 7. P. 1911. <https://doi.org/10.1002/cbdv.20090>
- Weremczuk-Jeżyna I., Kuźma Ł., Kiss A.K., Grzegorzczak-Karolak I. Effect of cytokinins on shoots proliferation and rosmarinic and salvianolic acid B production in shoot culture of *Dracocephalum forrestii* W.W. Smith // Acta Physiol. Plant. 2018. V. 40. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2763-z>
- Li G.S., Jiang W.I., Tian J.W., Qu G.W., Zhu H.B., Fu F.H. *In vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis // Phyto-medicine. 2010. V. 17. P. 282. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.002>
- Inyunshina Y.V., Bulgakov V.P., Veselova M.V., Bryukhanov V.M., Zverev Y.F., Lampatov V.V., Azarova O.V., Tchomodod G.K., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. High rabdosin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* callus cultures and the effect of the calli on Masugi-nephritis in rats // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. P. 1286. <https://doi.org/10.1271/bbb60684>
- Jaiong R.W., Lou K.M., Hon P.M., Mak T.C., Woo K.S., Fung K.P. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza* // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12. P. 237. <https://doi.org/10.2174/0929867053363397>
- Hosni K., Msaada K., Ben Taârit M., Marzouk B. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. // Biochem. Syst. Ecol. 2011. V. 39. P. 43. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.01.001>
- Jordán M.J., Martínez R.M., Goodner K.L., Baldwin E.A., Sotomayor J.A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition // Ind. Crop Prod. 2006. V. 24. P. 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.011>
- Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages // Food Chem. 2008. V. 110. P. 927. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.083>
- Abbasi N., Fattahi M., Ghosha Y., Sefidkon F. Volatile compounds and antifungal activity of *Dracocephalum moldavica* L. at different phenological stages // J. Essent. Oil Res. 2022. V. 34. P. 87. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1975577>
- Kotyuk L.A., Ivashchenko I.V., Korablova O.A., Rakhmetov D.B. Impact of climate variability on the duration of phenological quality of *Dracocephalum moldavica* L. in agroclimatic zones of Polissya and Forest-Steppe in Ukraine // Ukr. J. Ecol. 2021. V. 11. P. 39. https://doi.org/10.15421/2021_240
- Fattahi M., Bonfill M., Fattahi B., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Palazon J. Secondary metabolites profiling of *Dracocephalum kotschyi* Boiss at three phenological stages using uni- and multivariate methods // J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 2016. V. 3. P. 177. <https://doi.org/10.1016/j.jarmp.2016.04.002>
- Mohtashami S., Babalar M., Mirjalili M.H. Phenological variation in medicinal traits of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) under different growing conditions // J. Herbs Spices Med. Plants. 2013. V. 19. P. 377. <https://doi.org/10.1080/10496475.2013.811146>
- Nakonechnaya O.V., Gafitskaya I.V., Grigorchuk V.P., Gorpenchenko T.Y., Bezdelev A.B., Zhuravlev Y.N. Polyphenol composition of *Dracocephalum charkeviczii* Prob. plants in *in situ* and *in vitro* conditions // Russ. J. Plant. Physiol. 2022. V. 69. P. 27. <https://doi.org/10.1134/S1021443722010149>
- Безделев А.Б., Безделева Т.А. Жизненные формы семенных растений российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2006. 296 с.
- Kozhevnikov A.E., Kozhevnikova Z.V., Kwak M., Lee B.Y. Illustrated flora of the Primorsky Territory [Russian Far East]. National Institute of Biological Resources, Incheon, 2019. 1126 с.
- Пробатова Н.С., Баркалов В.Ю., Нечаев В.А. Хромосомные числа сосудистых растений в Приморском крае: дальнейшее изучение // Ученые записки ЗабГУ. Серия: Естественные науки. 2016. Т. 11. № 1. С. 27.
- Weremczuk-Jeżyna I., Skala E., Kuźma Ł., Kiss A.K., Grzegorzczak-Karolak I. The effect of purine-type cytokinin on the proliferation and production of phenolic compounds in transformed shoots of *Dracocephalum*

- forrestii* // J. Biotechnol. 2019. V. 306. P. 125.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.014>
22. Vassallo A., Cioffi G., De Simone F., Braca A., Sanogo R., Vanella A., Russo A., De Tommasi N. New flavonoid glycosides from *Chrozophora senegalensis* and their antioxidant activity // Nat. Prod. Commun. 2006. V. 1. P. 1089.
<https://doi.org/10.1177/1934578X0600101204>
 23. Holser R.A. Lipid encapsulated phenolic compounds by fluidization // J. Encapsulation Adsorpt. Sci. 2013. V. 3. P. 13.
<https://doi.org/10.4236/jeas.2013.31002>
 24. Bystrom L.M., Lewis B.A., Brown D.L., Rodriguez E., Obendorf R.L. Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. “Montgomery” fruits // Food Chem. 2008. V. 111. P. 1017.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058>
 25. Allen F., Greiner R., Wishart D. Competitive fragmentation modeling of ESI–MS/MS spectra for putative metabolite identification // Metabolomics. 2015. V. 11. P. 98.
<https://doi.org/10.1007/s11306-014-0676-4>
 26. Yosr Z., Hnia Ch., Rim T., Mohamed B. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity // Ind. Crops Prod. 2013. V. 43. P. 412.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.044>
 27. Aziz E.E., Ezz El-Din A.A., Omer E.A. Quantitative and qualitative changes in essential oil of *Dracocephalum moldavica* at different growth stages // Int. J. Acad. Res. 2010. V. 2. P. 198.
 28. Del Bano M.J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., Del Rio J.A., Ortuño A., Quirin K.-W., Gerard D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis* antioxidant activity // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 4247.
<https://doi.org/10.1021/jf0300745>
 29. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 218.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
 30. Fattahi M., Nazeri V., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Zamani Z., Palazon J. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC–DAD–ESI–MS // Food Chem. 2013. V. 141. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.019>

УДК 581.1

ПОЛУЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМОЙ ЭМБРИОГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *Papaver rupifragum* BOISS. & REUT. И ЕЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ И БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2023 г. Н. И. Румянцева^{a, b, *}, Ю. А. Костюкова^a, А. И. Валиева^a, А. Н. Акулов^a, М. В. Агеева^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра

“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^bКазанский федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: nat_rumyantseva@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 21.10.2023 г.

Впервые получена эмбрионная культура мака скалоломного *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut., которая была инициирована на корнях проростков, выращиваемых из семян на МС-среде с добавлением 1 мг/л ИМК. Последующее поддержание эмбрионной культуры осуществляли на безгормональной МС-среде. Длительное культивирование и сохранение эмбрионной способности культуры (более 5 лет) поддерживалось благодаря циклам адвентивного эмбриоидогенеза, включающим образование каллуса на предсуществующих эмбриоидах и индукцию из их субповерхностных клеток новых эмбриоидов. В связи с этим полученная культура *P. rupifragum* может рассматриваться как дифференцированная культура, в которой стадия каллуса является промежуточным этапом развития. Установлено, что поверхность вновь образуемых эмбриоидов покрыта поверхностной сетью экстраклеточного матрикса, сформированной полисахаридами, липидами и терпенами. Гистологический анализ показал, что для эмбрионной культуры *P. rupifragum* характерно образование комплексов слитых эмбриоидов (КСЭ), возникающих, предположительно, либо в результате кливажной полиэмбрионии, либо при синхронном развитии близлежащих эмбриоидов. Изучение гистологии и ультраструктуры КСЭ выявило, что слияние эмбриоидов обусловлено нарушениями в формировании эпидермиса и кутикулы. Гистохимические исследования установили, что эмбрионная культура *P. rupifragum* синтезирует и накапливает триацилглицериды, полисахариды, фенольные соединения (ФС), терпены и алкалоиды. Показано, что количественный и качественный состав ФС и алкалоидов культуры *P. rupifragum* зависит от возраста культуры и ее дифференцировки, регулируемой условиями выращивания (свет, темнота). Дифференцированная эмбрионная культура *P. rupifragum* сохраняет способность к формированию эмбриоидов на безгормональной МС-среде в течение длительного времени культивирования и может являться основой для дальнейшей разработки биотехнологических методов получения лекарственных соединений для косметологии и фармакологии.

Ключевые слова: *Papaver rupifragum*, алкалоиды, адвентивный эмбриоидогенез, корни, липиды, терпены, фенольные соединения, эмбрионная культура

DOI: 10.31857/S0015330323600894, EDN: BFKIWY

ВВЕДЕНИЕ

Методы культуры клеток и тканей широко используются не только для оздоровления и быстрого размножения растений, но и для получения клеточных культур суперпродуцентов вторичных метаболитов [1]. Мак скалоломный (*Papaver rupi-*

fragum Boiss. & Reut.) привлекает внимание исследователей как декоративное многолетнее растение с крупными оранжевыми цветками, а также как потенциальный источник лекарственных соединений. Представители рода *Papaver* синтезируют алкалоиды различного типа, разнообразные фенольные соединения (ФС) и эфирные масла, которые имеют широкий спектр биологической активности и могут оказывать анальгезирующее, противомикробное, противовирусное, антидиабетическое и другое действие [2]. Методы получения и культивирования клеточных культур разра-

Сокращения: КСЭ – комплекс слитых эмбриоидов, ПСЭКМ – поверхностная сеть экстраклеточного матрикса, МС-среда – среда Мурасиге и Скута, ТС – толудиновый синий, ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия, ФС – фенольные соединения.

ботаны для многих видов мака: *P. somniferum* [3, 4], *P. bracteatum* [5], *P. orientale splendidissimum* [4]. Установлено, что только эмбрионные клеточные культуры рода *Papaver* обладают способностью к синтезу алкалоидов [2, 6]. Получение клеточных культур *P. rupifragum* до сих пор не было описано. Поэтому в задачи нашей работы входило получение эмбрионной культуры *P. rupifragum*, ее цитологическое изучение, а также гистохимический и биохимический анализ соединений, синтезируемых культурой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена *Papaver rupifragum* Boiss. & Reut. были получены из Ботанического сада лекарственных растений Казанского государственного медицинского университета. Для индукции каллуса семена стерилизовали 2 мин в 70% этиловом спирте, 10 мин в 45% растворе “Белизны” (содержание NaOCl — 10%), трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали на МС-среду [7] с добавлением 1 мг/л ИМК, 30 г/л сахарозы и 0.8% агара. Семена проращивали при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ на свету (плотность потока фотосинтетических фотонов $35 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$), фотопериод 16/8 ч (свет/темнота). После того как на корнях проростков сформировался первичный каллус и на нем начали появляться эмбриониды, их переносили на МС-среду без гормонов. Дальнейшее субкультивирование эмбрионной культуры проводили на этой же среде каждые 30 сут. на свету и в темноте при температуре $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Гистологические и электронно-микроскопические исследования проводили по ранее использованной методике [8]. Для этого каллус и эмбриониды фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) с постфиксацией в 1% OsO_4 . Далее ткань обезвоживали в ряде спиртов с постепенным повышением концентрации, 100% ацетоне, 100% пропиленоксиде и заключали в эпоксидную смолу эпон-812. Для приготовления гистологических препаратов полутонкие срезы (3 мкм толщины), сделанные с помощью ультрамикротомы Ultra Cut E (“Reichert-Jung”, Австрия), окрашивали 0.5% толуидиновым синим и изучали с помощью микроскопа Jenamed (“Carl Zeiss”, Германия) и фотографировали, используя цифровую насадку AxioCam MRc5 с программным обеспечением AxioVision Rel. 4.6. Для электронно-микроскопических исследований срезы (70–100 нм толщины), сделанные с помощью ультрамикротомы LKB 8800 (“LKB”, Швеция), монтировали на никелевые сеточки и окрашивали последовательно 2% уранилацетатом и цитратом свинца. Исследования проводили на микроскопе “Hitachi 7800” (“Hitachi”, Япония).

Гистохимическое окрашивание эмбрионной культуры выполняли на прижизненных срезах толщиной 15–20 мкм, сделанных на вибраторе VT100S (“Leica”, Германия). Для приготовления прижизненных срезов образцы каллуса и эмбрионидов заключали в блоки из 3% агарозы, приготовленной на дистиллированной воде. Непрерывная подача ножа составляла 2.5 мм/с, частота вибрации ножа — 60 Гц. Нарезанные срезы помещали в дистиллированную воду, окрашивание проводили сразу после нарезки.

Срезы, зафиксированные в эпоксидную смолу, окрашивали 0.5% толуидиновым синим (ТС), приготовленным на 0.1% растворе Na_2CO_3 (pH 11.1). Окрашивание проводили на предметном столике Slides Warmer ХН-2002 (“C&A Scientific”, США) при 60°C в течение 1–6 мин и затем отмывали дистиллированной водой.

Для выявления липидов прижизненные срезы окрашивали в течение 10 мин 0.3% раствором Судана III, приготовленного на 70% спирте, затем отмывали дистиллированной водой, помещали в каплю дистиллированной воды и накрывали покровным стеклом. Локализацию терпенов определяли на прижизненных срезах с помощью реактива NADl как описано ранее [9].

Срезы исследовали с помощью микроскопа Jenamed (“Carl Zeiss”, Германия), используя программное обеспечение Axiovision Rel 4.6, и фотографировали с помощью цифровой камеры Axio Cam MRc5 (“Carl Zeiss”, Германия). Депонирование алкалоидов изучали в УФ на микроскопе Axio Scope A1 (“Carl Zeiss”, Германия), $\lambda = 365 \text{ нм}$.

Для биохимических исследований эмбрионную культуру лиофильно высушивали на сублимационной сушилке Alpha 1-4 LD-2 (“Martin Christ”, Германия) и размалывали на шаровой мельнице MM400 (“Retsch”, Германия) при частоте 25 Гц в течение 3 мин.

Для выделения ФС и алкалоидов 50 мг лиофильно высушенной эмбрионной культуры заливали 0.5 мл подкисленного 70% этанола (конечная концентрация уксусной кислоты 0.5%), обрабатывали ультразвуком (УЗ) (10 мин, 30 кГц, 20°C) и инкубировали в течение 1 ч при 80°C . Гомогенат центрифугировали (10 мин, 10000 g), супернатант отбирали. К осадку добавляли 0.5 мл 70% подкисленного этанола, обрабатывали УЗ, инкубировали 0.5 ч при 80°C и затем центрифугировали. Объединенные супернатанты использовали для выделения алкалоидов, определения содержания растворимых ФС, проведения ТСХ и ВЭЖХ-анализа ФС.

Общее содержание растворимых ФС определяли на спектрофотометре LAMBDA 25 (“Perkin-Elmer”, США) по методу Фолина-Чокальтеу [10] и рассчитывали в мг-экв. галловой кислоты на 1 г сухого веса.

Для экстракции алкалоидов 500 мкл спиртового экстракта высушивали при 35°C, 20 ГПа на вакуумном концентраторе ("Concentrator plus, Eppendorf", США). К высушенному экстракту добавляли 100 мкл 2 N HCl, обрабатывали ультразвуком, центрифугировали (5 мин, 10000 g), супернатант отбирали, к осадку добавляли 100 мкл 2 N HCl и процедуру повторяли. Объединенный супернатант, содержащий алкалоиды в виде водорастворимых солей, отмывали от липофильных веществ 1 мл хлороформа. Верхнюю водную фазу отбирали и нейтрализовали равным объемом 2 N NaOH. Объем нейтрализованного раствора доводили водой до 0.5 мл.

Спектрофотометрическое определение алкалоидов. К 50 мкл нейтрализованного раствора, содержащего алкалоиды, добавляли 0.5 мл 0.25 М цитратно-фосфатного буфера (pH 4.7) и 0.5 мл 0.1 мМ бромкрезолового зеленого (БКЗ). Для формирования ионной пары БКЗ-алкалоид реакционную смесь выдерживали 5 мин при комнатной температуре и затем экстрагировали дважды хлороформом. Для этого к реакционной смеси добавляли 0.5 мл хлороформа, перемешивали, нижнюю хлороформенную фазу отбирали, а к водной фазе добавляли 0.5 мл хлороформа и повторяли процедуру. Хлороформенные извлечения объединяли и конечный объем образца доводили хлороформом до 1 мл. Образцы сканировали на спектрофотометре LAMBDA 25 ("PerkinElmer", США) в диапазоне от 350 до 550 нм. Максимум поглощения ионной пары БКЗ-алкалоид находится в диапазоне 418 ± 2 нм. Для получения бланка 0.5 мл буфера смешивали с 0.5 мл БКЗ и проводили экстракцию хлороформом как описано выше. Для построения калибровочной кривой использовали 0.1% раствор папаверина гидрохлорида в концентрации от 2 до 10 мкг. Подготовку образцов проводили как описано выше.

Для ТСХ вторичных соединений использовали пластины "Sorbfil" ПТСХ-АФ А-УФ. Этанольные образцы (5 мкл) наносили на стартовую линию в виде полос шириной 4–5 мм. Разделение веществ проводили в отобранной верхней фазе смеси этилацетат–уксусная кислота–муравьиная кислота–вода (90 : 10 : 10 : 24) [11]. ТСХ-пластину рассматривали при 312 нм на трансиллюминаторе TSP-20 MC ("Vilbert Lourmat", Франция). Для проявления пятен алкалоидов на пластинах применяли реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье [11].

Исследование ФС методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) проводили на хроматографической системе высокого давления BioLogic DuoFlow™ ("BioRad", США). В качестве неподвижной фазы использовали колонку с обращенной фазой "Symmetry® C18", размер колонки — 3.9×150 мм ("Waters", США), наполнитель с раз-

мером частиц 5 мкм и размером пор 100 Å ("Waters", США). В качестве подвижной фазы были использованы следующие растворы: раствор А — 6% уксусная кислота, раствор Б — 80% ацетонитрил. Градиент был создан по следующей схеме: 0–4 мин — 100% раствор А, 4–6 мин — 100% раствор А и 25% раствор Б, 6–8 мин — 25% раствор Б, 13–16 мин — 25–30% раствор Б, 16–26 мин — 30–65% раствор Б; 26–31 мин — 65% раствор Б; 31–41 мин — 65–100% раствор Б; 41–46 мин — 100% раствор Б; 46–47 мин — 100% раствор Б и 100% раствор А; 47–55 мин — 100% раствор А. Скорость подачи подвижной фазы — 0.6 мл/мин. Объем вводимой пробы 50 мкл. Детекцию пиков фенольных соединений осуществляли посредством детектора BioLogic QuadTec UV/Vis ("BioRad", США) при длине волны 280 и 360 нм. Идентификацию пиков фенольных кислот и флавоноидов выполняли относительно времени удерживания на колонке известных ФС (галловая, р-кумаровая, феруловая, синаповая, бензойная кислоты, рутин, кверцетин, кемпферол) ("Sigma-Aldrich", США). Для расчетов использовали значения площадей пиков полученных хроматограмм, выраженные в мкВ·с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование первичного светло-коричневого каллуса наблюдали на корнях проростков *P. rupifragum* через две недели их культивирования на МС-среде с добавлением 1 мг/л ИМК (рис. 1а). Белые блестящие уплотнения на поверхности каллуса появлялись через 1–2 мес. (рис. 1б). Проведенные гистологические исследования позволяют рассматривать первичные белые уплотнения как аномально развивающиеся эмбриониды, поскольку в них происходила дифференцировка апикального и базального полюсов с образованием биполярной структуры, характерной для соматических зародышей (рис. 1в). Эмбриониды имели протодерму, но в некоторых местах ее целостность была нарушена (рис. 1г). Эмбриониды были покрыты поверхностной сетью экстраклеточного матрикса (ПСЭКМ), розово-сиреневое окрашивание толуидиновым синим свидетельствует о присутствии в ней полисахаридов (рис. 1в, 1г). ПСЭКМ, образованная секретируемыми соединениями различной природы — это морфологическая структура, характерная для кластеров эмбриогенных клеток и глобулярных эмбрионидов разных видов растений [12]. При дальнейшем культивировании на среде с ИМК у эмбрионидов *P. rupifragum* происходила дифференцировка апекса стебля с образованием небольших светлых зеленых семядолей, но развитие корня отсутствовало (рис. 1д). Гистологические исследования выявили, что у первичных эмбрионидов нарушена дифференцировка сосудистой системы и проис-

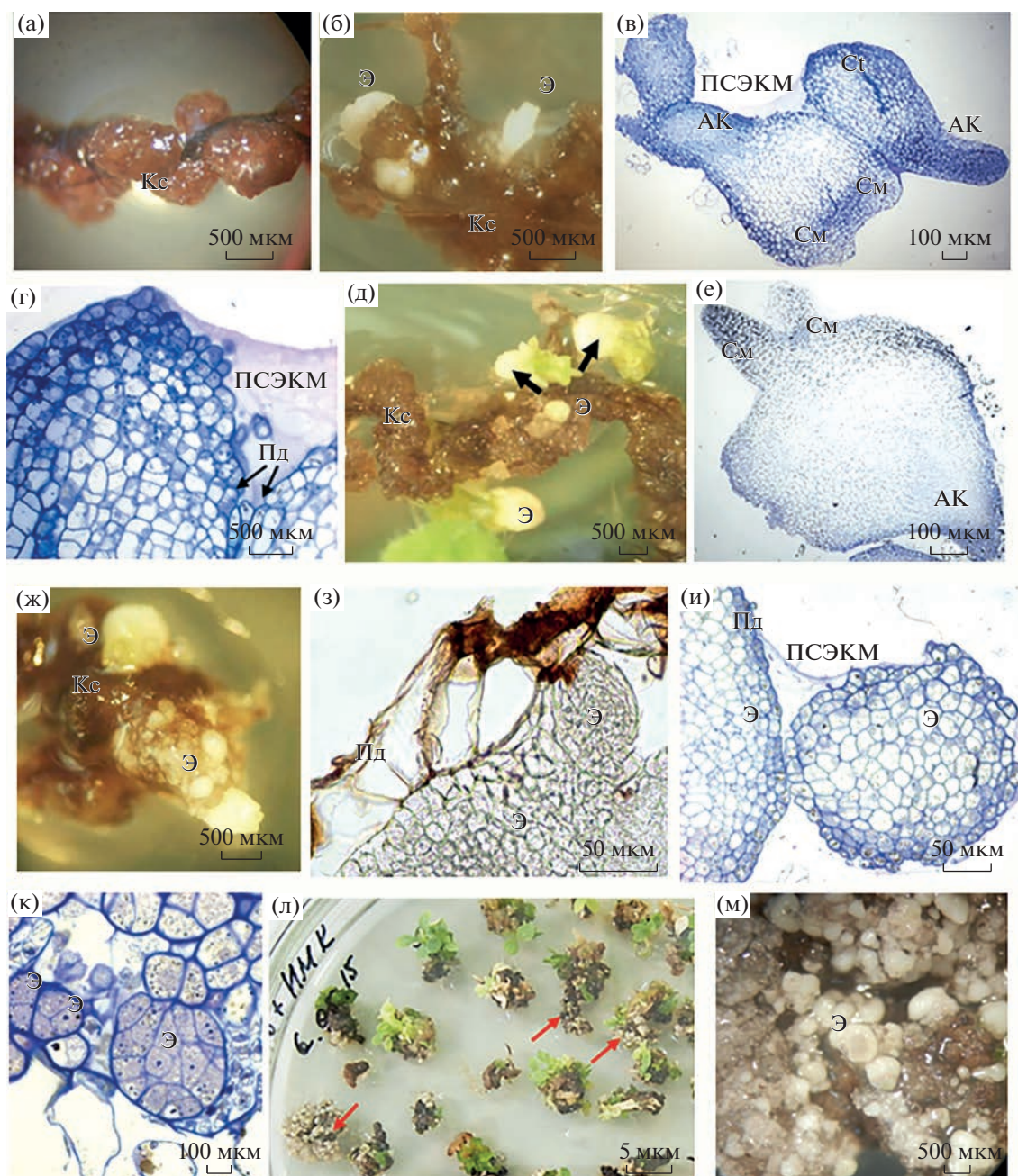


Рис. 1. Образование эмбриогенной культуры на корнях проростков *P. rupifragum*: а – индукция первичного каллуса на корнях; б – появление белых уплотнений на поверхности каллуса через 1–2 мес. культивирования на МС-среде с добавлением 1мг/мл ИМК; в, г – сердечковидные эмбриониды, покрытые слоем ПСЭКМ; д – формирование семядолей у эмбрионидов на МС-среде с добавлением ИМК на свету; е – торпедовидный эмбрионид с разросшейся центральной частью; ж – формирование вторичных эмбрионидов на безгормональной МС-среде на каллусе, образовавшемся на первичных эмбриоидах; з – субповерхностное формирование вторичных эмбрионидов; и – формирование ПСЭКМ при образовании вторичных эмбрионидов; к – множественная субэпидермальная инициация эмбрионидов; л – дифференцировка семядолей у эмбрионидов на безгормональной МС-среде на свету, стрелка указывает на формирование каллуса на базальной части КСЭ и образование на поверхности каллуса эмбрионидов; м – формирование эмбрионидов при субкультивировании на безгормональной МС-среде в темноте; развитие семядолей отсутствует. АК – апекс корня, Кс – каллус, Пд – протодерма, См – семядоля, Э – эмбрионид.

ходит разрастание центральной части эмбриоида за счет деления паренхимных клеток (рис. 1е). При переносе на безгормональную МС-среду на первичных эмбриоидах формировался мягкий

ослизненный каллус, на поверхности которого затем появлялись вторичные эмбриониды (рис. 1ж). Разрыхление эмбрионидов и формирование каллуса происходило в результате деления центральных

паренхимных клеток, и лизиса клеток протодермы. Новые эмбриониды возникали преимущественно из субповерхностных клеток (рис. 1з). На рис. 1ж показано, что вновь возникающие эмбриониды лежат на поверхности каллуса, находятся на разных стадиях развития и покрыты слизистым секретом (рис. 1и). Судя по множественной инициации новых эмбрионидов (рис. 1к), к эмбриогенному развитию было способно большое число клеток первичного каллусирующего эмбриоида. Дальнейшее развитие эмбрионидов имело свои особенности и зависело от светового режима. При субкультивировании эмбрионидов на МС-среде на свету в течение 1 мес. происходило развитие эмбрионидов от стадии глобулы до стадии формирования семядолей, но ризогенез отсутствовал. Затем, базальная часть эмбрионидов образовывала мягкий ослизненный каллус-няньку с последующим формированием новых эмбрионидов, развивающихся на поверхности каллуса (рис. 1л). При отборе каллуса с эмбриоидами и дальнейшем культивировании их на свету цикл развития эмбрионидов повторялся и проходил от глобулы до стадии развития семядолей. При культивировании в темноте развитие семядолевых листьев отсутствовало (рис. 1м), но поддержание каллуса всегда сопровождалось последовательными циклами разрыхления эмбрионидов, образованием каллуса и формированием новых эмбрионидов. Полученная дифференцированная культура *P. rupifragum* сохраняла способность к формированию эмбрионидов на безгормональной МС-среде более пяти лет.

Интересно, что на МС-среде, как в темноте, так и на свету, мы очень редко наблюдали развитие отдельных зародышей, но отмечали образование бесхлорофильных крупных округлых структур (рис. 1м), на свету часто имеющих зеленую верхушку, и состоящих из эмбрионидов на стадии торпедо или формирования семядолей, слитых поверхностями (рис. 2а, 2в). Для таких структур мы ввели термин “комплексы слитых эмбрионидов” (КСЭ).

Поперечный срез каллуса с КСЭ на разных стадиях развития показывает, что культура имеет гетерогенную структуру и образована мелкими глобулами (50–70 мкм), средними глобулами (200–300 мкм), крупными глобулами (около 1 мм), которые разделены и окружены каллусными клетками (рис. 2б). На рис. 2б видно, что поперечный срез крупной глобулы является поперечным срезом КСЭ (рис. 2а). На продольном срезе КСЭ отчетливо видимый эпидермис характерен только для развивающихся семядолей; в базальной части КСЭ эпидермис фрагментарный (рис. 2г). Развитие корней у КСЭ отсутствует.

Изучение гистологии и ультраструктуры КСЭ показало, что слияние эмбрионидов обусловлено отсутствием формирования полноценного эпи-

дермиса вследствие нарушения синтеза кутикулярного слоя (рис. 2д, 2е, 2ж, 2з). На рис. 2е видно, что с поверхности клетки “отшелушиваются” слои клеточных стенок; вероятно, нарушение полимеризации компонентов клеточных стенок и кутикулы обуславливают формирование ПСЭКМ, окружающей развивающиеся эмбриониды. Как упоминалось ранее, образование новых эмбрионидов происходит преимущественно из базальной части КСЭ (рис. 1л). На продольном гистологическом срезе КСЭ хорошо видно, что в “слитых” эмбриоидах этот процесс может начинаться до стадии формирования семядолей (рис. 2з, и).

При гистологическом (рис. 2л) и электронномикроскопическом исследовании (рис. 2м–2н) семядолевых листьев эмбрионидов были обнаружены клетки с многочисленными везикулами в цитоплазме, расположенные вдоль ситовидных клеток сосудистых пучков. Предполагается, что эти клетки представляют собой млечники. Клетки аналогичного строения, формирующие длинные тяжи, параллельные сосудам флоэмы, были идентифицированы в проростках *P. somniferum* [13].

Гистохимический анализ выявил, что в клетках как глобулярных эмбрионидов (рис. 3а, 3б), так и в КСЭ (рис. 3в, 3г–3е) накапливаются липофильные соединения, окрашиваемые Суданом III. Известно, что Судан III окрашивает как жирные масла, представленные преимущественно триацилглицеридами, и локализованные в сферосомах цитоплазмы, так и эфирные масла, основу которых составляют терпены и их производные [14]. Чтобы дифференцировать терпены от триацилглицеридов мы использовали специфичный для терпенов краситель NADI и выявили, что терпены накапливаются как в глобулярных эмбриоидах (рис. 3ж, з), так и в КСЭ (рис. 3к–3м). При этом оба реактива окрашивали в клетках мелкие округлые структуры (рис. 3а, 3б, 3и, 3м). Было отмечено, что на поверхности глобулярных эмбрионидов имеется слой, окрашиваемый как Суданом III (рис. 3а), так и реактивом NADI (рис. 3ж, 3з). Вероятно, ПСЭКМ, характерная для кластеров эмбриогенных клеток и глобулярных эмбрионидов, также содержит терпены. Интересно, что клетки мягкого каллуса-няньки, лежащие вокруг эмбрионидов, имели наиболее крупные включения терпенов (рис. 3и).

Окрашивание Суданом III прижизненных срезов КСЭ, выращиваемых на свету (рис. 3в), обнаружило, что липофильные соединения полностью заполняют цитоплазму клеток в базальной части КСЭ (рис. 3г–3е). При этом при использовании реактива NADI видно, что окрашиваются только округлые структуры разного размера, а цитоплазма остается бесцветной (рис. 3л, 3м). Вероятно, базальные клетки КСЭ накапливают как терпены в везикулах, так и триацилглицериды в

сферосомах, поэтому при использовании Судана III базальные клетки окрашиваются почти полностью. В “верхушке” КСЭ, сформированной развивающимися семядолями, оба гистохимических красителя выявляли только мелкие округлые структуры (рис. 3г, 3д, 3к, 3л).

Синтез и накопление липофильных соединений в эмбриогенной культуре *P. rupifragum* были подтверждены при изучении ультраструктуры клеток глобулярных эмбриоидов. На электронно-микроскопических снимках цитоплазма клеток эмбриоидов, особенно клеток протодермы, заполнена многочисленными сферосомами (рис. 4а–4г). В клетках эмбриоидов также присутствуют небольшие вакуоли с осмиофильным преципитатом (рис. 4а, 3в, 3д), вероятно, ФС, возможно, алкалоидами. Осмиофильные отложения визуализировались как по тонопласту вакуолей (рис. 4б, 3в, 3д), так и в виде крупных округлых включений (рис. 4д). Эти вакуоли всегда отделены от плазмалеммы слоем сферосом и занимают более центральное положение. Клетки эмбриоидов имеют многочисленные активные митохондрии (рис. 4в, 4д), пластины содержат крупные зерна крахмала (рис. 4г, 4е, 4ж). Стоит особо отметить многообразие липидных телец, присутствующих в клетках эмбриоидов. Они локализованы не только в цитоплазме и различаются по цвету и величине, но и в пластидах (рис. 4в, 4е, 4ж). Во многих пластидах можно выявить минимум одну пластоглобулу (рис. 4е, 4ж). Пластоглобулы так же отличаются по размеру и плотности контрастирования OsO_4 и, вероятно, образованы разными соединениями. Но их размеры значительно меньше размеров липидных телец в цитоплазме.

Исследование эмбриогенной культуры в УФ обнаружило желто-зеленую внутриклеточную автофлуоресценцию каллусных клеток (рис. 5а, 5б), окружающих эмбриоиды, что может свидетельствовать о накоплении алкалоидов в каллусной культуре [15]. Голубая автофлуоресценция в отдельных поверхностных клетках эмбриоидов может свидетельствовать о накоплении в них фенольных кислот (рис. 5в, 5г).

Как следует из табл. 1, при выращивании в темноте общее содержание растворимых ФС и общее содержание алкалоидов в культуре увеличивается в зависимости от длительности пассажа: в 4-недельной культуре содержание ФС и алкалоидов выше, чем в 2-недельной культуре. При этом, содержание ФС увеличивается всего на 20%, тогда как алкалоидов — в 2.6 раза. Общее содержание ФС и алкалоидов в 3-недельной культуре на свету меньше, чем в 2-недельной культуре в темноте, но разница статистически не достоверна.

Проведенный ТСХ анализ этанольного экстракта выявил наличие пятен, окрашиваемых реактивом Драгендорфа, во всех вариантах исследуемой культуры, которые отличались как по интенсивности окрашивания, так и по положению на ТСХ пластине (рис. 6б). Пятна, наиболее интенсивно флуоресцирующие при 312 нм (рис. 6а), как правило, наиболее сильно окрашивались реактивом Драгендорфа. Видно, что культуры разного возраста (4 и 2 нед.), выращиваемые в темноте, имели разную интенсивность как окрашивания пятен реактивом Драгендорфа, так и флуоресценции, что коррелирует с почти 3-кратным различием в общем содержании алкалоидов. Интересно, что культура, выращиваемая на свету, значительно больше отличалась по количеству пятен и интенсивности их свечения от темновых культур, чем темновые культуры разного возраста отличались между собой. Следует отметить, что не все флуоресцирующие пятна окрашивались реактивом Драгендорфа, поскольку, с одной стороны, не все алкалоиды флуоресцируют, а с другой стороны, чувствительность реактива Драгендорфа может быть ниже чувствительности флуоресцентного анализа. К тому же разные алкалоиды в разной степени реагируют с реактивом Драгендорфа [16] и их содержания может быть недостаточно для явной позитивной реакции. Кроме того, не исключено, что отдельные пятна были “сложными” и представлены различными соединениями (например, ФС и алкалоидами).

При анализе спектра ФС спиртовых экстрактов трех вариантов эмбриогенной культуры было выявлено наличие как свободных фенольных кислот (п-кумаровой, феруловой и 2,5-дигид-

Рис. 2. Особенности эмбриогенной культуры *P. rupifragum* при выращивании на свету: а — разнообразие эмбриогенных структур в культуре при развитии на свету; формирование семядольных листьев у отдельных эмбриоидов и у КСЭ (указано стрелкой); б — гистологический срез эмбриогенной культуры; стрелкой указан поперечный срез КСЭ (окрашивание ТС); в — морфология КСЭ, г — продольный срез КСЭ, д, е, ж — отсутствие кутикулы, отделение слоев клеточной стенки (сплошная стрелка) и разрыхление клеточных стенок (пунктирная стрелка) у прорастающих эмбриоидов, ТЭМ; з — гистологический срез КСЭ с формирующимися адвентивными эмбриоидами из клеток базальной части (окрашивание ТС), и — деталь рис. 2з, адвентивные эмбриоиды, развивающиеся из клеток базальной части КСЭ (окрашивание ТС); к — эмбриоиды *P. rupifragum* с семядольными листьями; л — гистологический срез семядольного листа с проводящей системой (окрашивание ТС); м — дифференцировка млечников с многочисленными мелкими вакуолями вдоль ситовидных элементов (окрашивание ТС); н — электронно-микроскопические особенности клеток млечников, ТЭМ. БЧ — базальная часть, В — вакуоль, ВЭ — верхний эпидермис, Кс — каллус, КС — клеточная стенка, Кр — крахмальное зерно, КСЭ — комплекс слитых эмбриоидов, ЛТ — липидное тельце, Мл — млечник, НЭ — нижний эпидермис, Пд — протодерма, ПрП — проводящий пучок, Пл — пластида, См — семядоля, СЭ — ситовидный элемент.

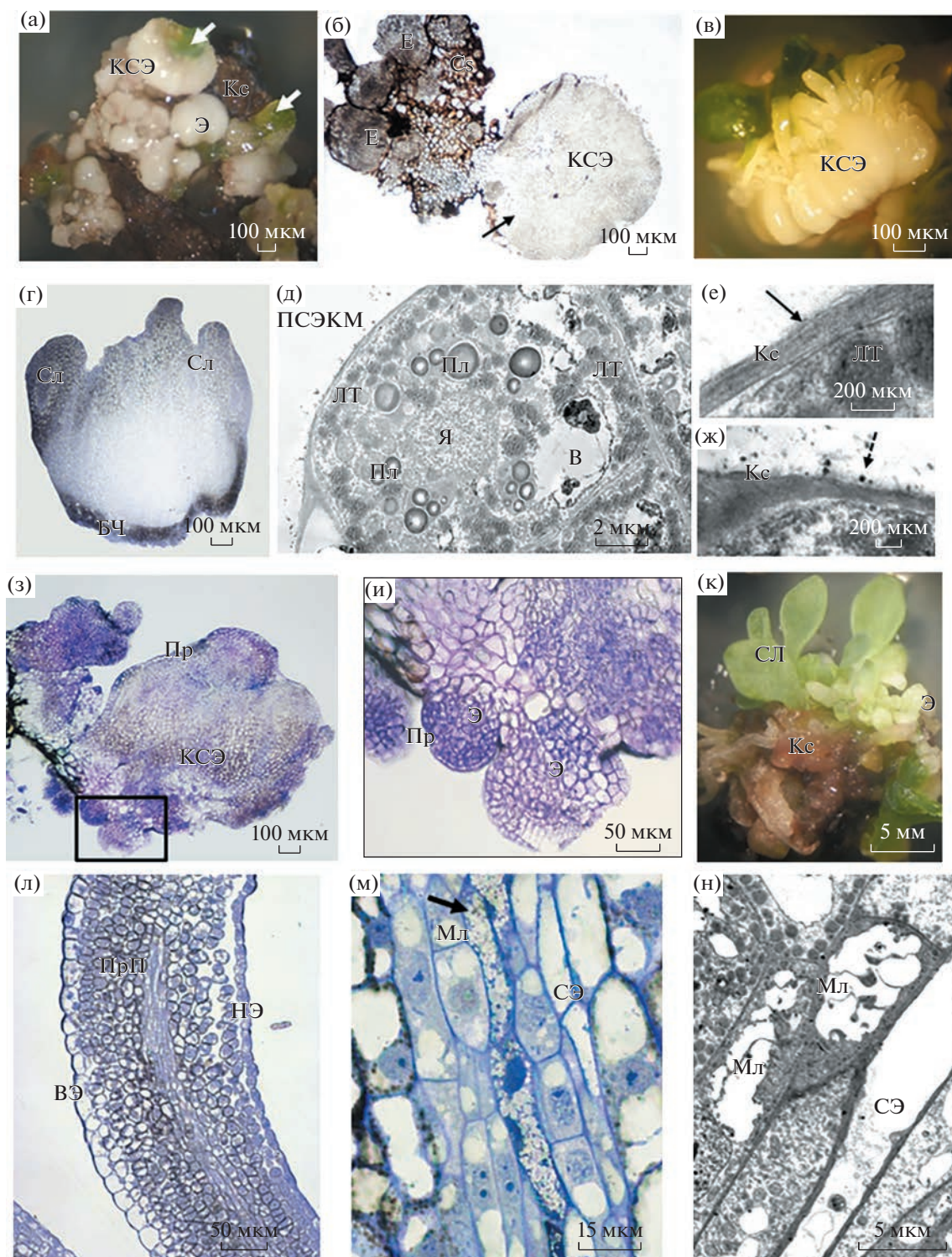


Таблица 1. Содержание алкалоидов и фенольных соединений в культуре *P. rupifragum* в зависимости от длительности пассажа и условий культивирования (темнота, свет).

	1	2	3
Содержание алкалоидов, мг/г сухого веса	$3.66 \pm 0.15b$	$1.41 \pm 0.11a$	$1.18 \pm 0.03a$
Содержание фенольных соединений, мг/г сухого веса	$20.80 \pm 0.64b$	$17.39 \pm 0.75a$	$14.99 \pm 0.58a$

Примечание: эмбриогенную культуру выращивали на безгормональной МС-среде 4 нед. в темноте (1), 2 нед. в темноте (2), 3 нед. на свету (3).

роксибензойной кислот), так и флавоноидов (кверцетина и кемпферола) (рис. 7). Отличия между вариантами носили в большей степени количественный характер, тем не менее, только в вариантах темнота (4 нед.) и свет, присутствовали кверцетин и кемпферол (рис. 7а, 7в). При этом у 2-недельной темновой культуры было отмечено появление крупного неидентифицированного пика (время удерживания 48.2 мин) (рис. 7б), который отсутствовал у культуры на свету (рис. 7в) и был по площади в 4.6 раза больше, чем этот же пик у 4-недельной темновой культуры (рис. 7а). На свету содержание п-кумаровой кислоты, исходя из площадей пиков, было значительно меньше, чем в темновых вариантах каллуса.

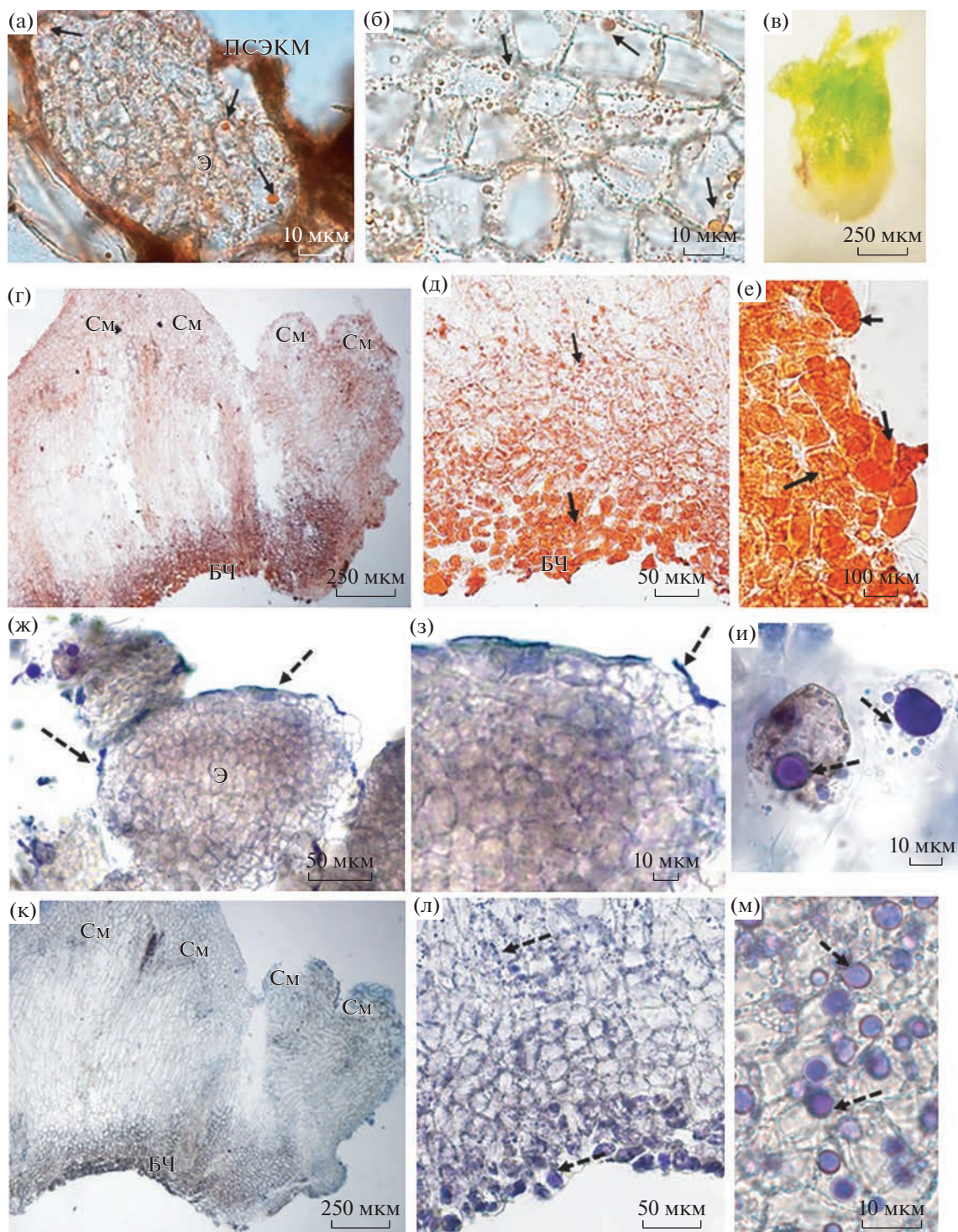
ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что культура *P. rupifragum* является эмбриогенной и дифференцированной, поскольку состоит из каллусных клеток и эмбриоидов на разных стадиях развития. Получение эмбриогенной культуры для *P. rupifragum* было описано впервые. Поддержание культуры происходит в результате повторяющихся циклов адвентивного эмбриогенеза на безгормональной МС-среде. Эмбриогеннокомпетентными являются отдельные субповерхностные клетки (или группы клеток) предсущего эмбриоида, в то время как остальная часть клеток эмбриоида либо формирует каллус, либо погибает. Особенностью гетерогенной культуры *P. rupifragum* является формирование многочисленных, плотно прилегающих друг к другу

или срастающихся (слитых) эмбриоидов. Образование КСЭ, вероятно, обусловлено, с одной стороны, множественной инициацией эмбриоидов, когда несколько близлежащих клеток (групп клеток) одного эмбриоида начинают синхронное развитие по пути эмбриогенеза (аналогично событиям, описанным при кливажной полиэмбрионии), а, с другой стороны, нарушениями в формировании полноценной кутикулы. Известно, что одна из функций кутикулы — это разделение органов развивающегося растения [17, 18]. Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, в которых синтез кутина был нарушен сверх-экспрессией гена кутиназы, имели измененную ультраструктуру кутикулы, нарушения в формировании эпидермиса, а также слившиеся органы [17]. Кливажная полиэмбриония как бесполое формирование нескольких зародышей из отдельных клеток зиготического зародыша на его ранних стадиях развития описана для зародышей *in vivo* [19]. Есть достоверные доказательства, что кливажная полиэмбриония на стадии проэмбрио наблюдается в эмбриогенных культурах голосеменных [20]. Вероятно, прямое образование эмбриоидов (без стадии каллуса) в культурах с повторяющимся циклами адвентивного эмбриогенеза также может рассматриваться как вариант кливажной полиэмбрионии.

Формирование эмбриоидов *P. rupifragum* сопровождалось развитием фибриллярной ПСЭКМ [21], описанной для эмбриогенных культур различных видов растений и характерной для проэмбрио и глобулярных эмбриоидов. Ранее ПСЭКМ, в состав которой входили арабиногалактановые бел-

Рис. 3. Гистохимическое изучение клеток эмбриоидов *P. rupifragum*: а — идентификация липофильных соединений Суданом III в глобулярном эмбриоиде и на его поверхности в качестве компонента ПСЭКМ; б — внутриклеточная локализация липофильных соединений при окрашивании Суданом III; мелкие липофильные тельца расположены вдоль клеточных стенок в клетках глобулярного эмбриоида; в — образование множественных зеленых семядолей в КСЭ; г — локализация липофильных соединений в клетках КСЭ (окрашивание Суданом III); видно увеличение накопления липофильных соединений от верхушки к основанию КСЭ; д — накопление липофильных соединений в клетках базальной части КСЭ, окраска Суданом III; е — деталь рис. 3д; клетки, полностью заполненные липофильными соединениями; ж — выявление терпенов с помощью реактива NADI в глобулярном эмбриоиде и в клетках каллуса; з — прерывистые отложения терпенов в виде слоя, окрашиваемого реактивом NADI, на поверхности глобулярного эмбриоида; и — терпен-содержащие везикулы разного размера в каллусных клетках эмбриогенной культуры *P. rupifragum*; к — гистологический срез КСЭ, окрашенного реактивом NADI; л — возрастание внутриклеточного накопления терпенов от семядолей к базальной части КСЭ; м — крупные везикулы и многочисленные мелкие везикулы, окрашиваемые реагентом NADI, в базальной части КСЭ. БЧ — базальная часть КСЭ, ЛТ — липофильное тельце, ПСЭКМ — поверхностная сеть экстраклеточного матрикса, См — семядоля, Э — эмбриоид. Сплошными стрелками указаны липидные тельца, окрашиваемые Суданом III, пунктирными стрелками указаны терпены, окрашиваемые реактивом NADI.



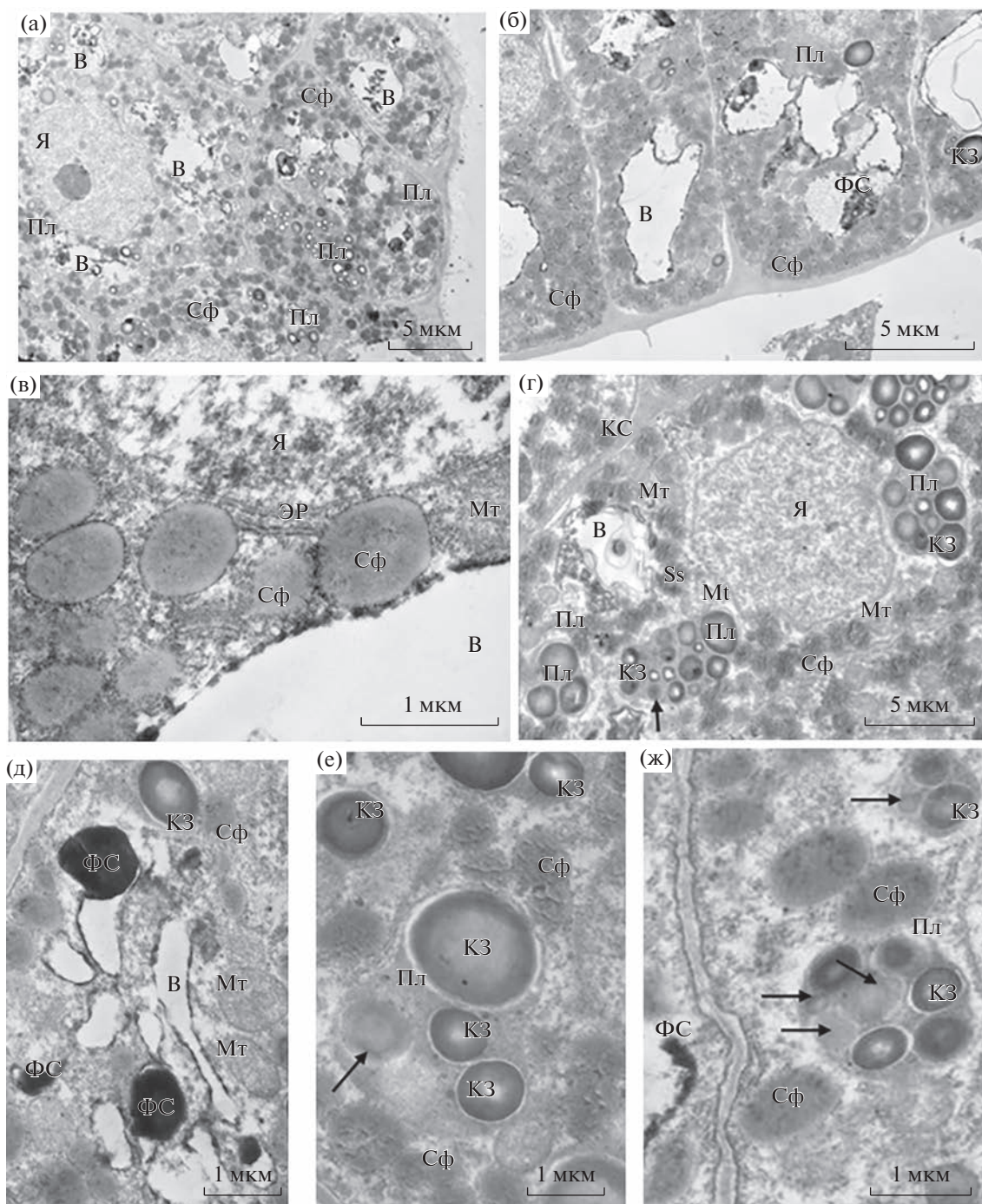


Рис. 4. Электронно-микроскопическое строение клеток эмбрионных структур *P. rupifragum*: а – клетки эмбриоида, содержащие сферосомы, пластиды с крахмальными зёрнами и мелкие вакуоли; б – клетки протодермы эмбриоида, с многочисленными сферосомами в цитоплазме; в – сферосомы, ассоциированные с ЭР; г – цитоплазма клеток с крупными амилопластами, содержащими многочисленные крахмальные зёрна, митохондриями и сферосомами; д – округлые осмиофильные включения и отложение осмиофильного материала по тонопласту в вакуолях; е, ж – пластиды с крахмальными зёрнами и пластоглобулами. В – вакуоль, Мт – митохондрия, КЗ – крахмальное зерно, Пл – пластида, Сф – сферосома, ФС – фенольные соединения, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Я – ядро; пластоглобулы указаны стрелкой.

ки и полисахариды, была обнаружена нами в эмбрионном каллусе *Fagopyrum tataricum* [22]. Гистохимически было показано, что в состав ПСЭКМ, обнаруживаемой на поверхности про-

эмбрио и эмбриоидов *P. rupifragum*, входят полисахариды и соединения липофильной природы (липиды и терпены). Ранее липиды были идентифицированы в ПСЭКМ андрогенного каллуса

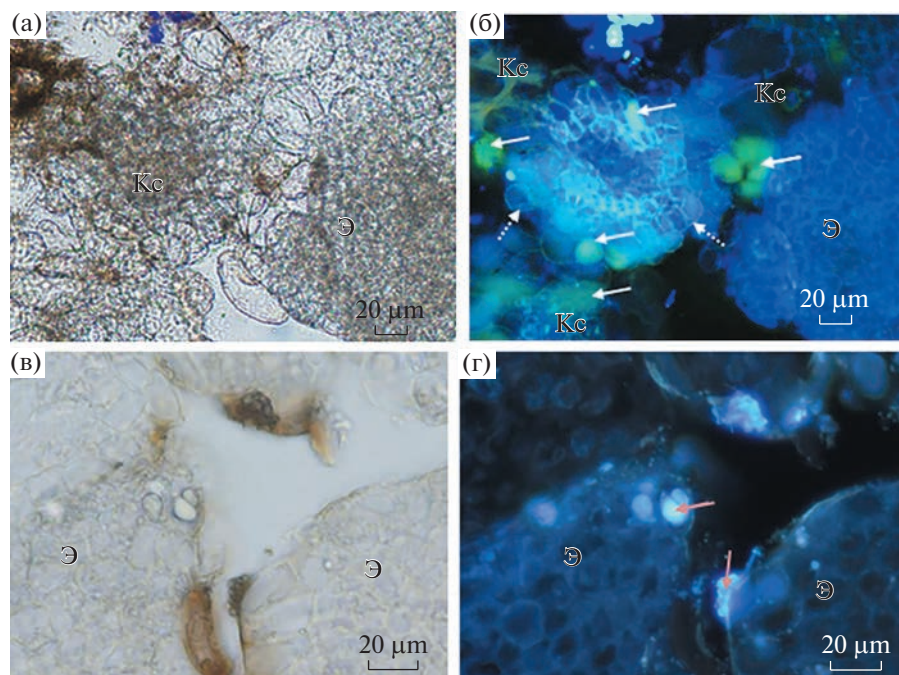


Рис. 5. Автофлуоресценция в клетках эмбрионной культуры *P. rupifragum* при освещении прижизненных срезов УФ: а, в — прижизненные срезы эмбриоидов, б — автофлуоресценция внутриклеточных включений и клеточных стенок в паренхимных клетках каллусной ткани, г — автофлуоресценция в единичных поверхностных клетках эмбриоидов. Кс — каллус, Э — эмбриоид. Белыми сплошными стрелками указана желто-зеленая автофлуоресценция алкалоидов в каллусных клетках, белой пунктирной стрелкой — автофлуоресценция клеточных стенок; розовыми стрелками указана голубая автофлуоресценция фенольных кислот.

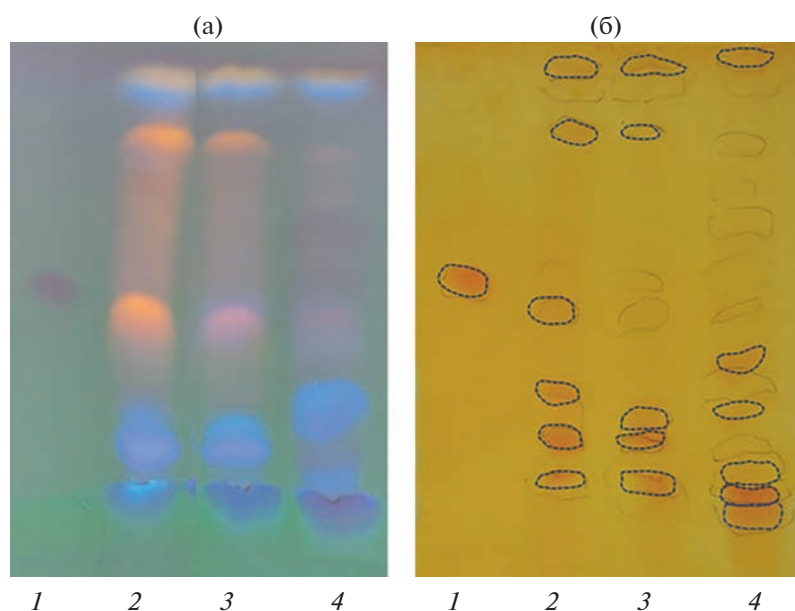


Рис. 6. ТСХ этанольного экстракта эмбрионных культур *P. rupifragum*, культивируемых в разных условиях. 1 — папаверина гидрохлорид, 4 мкг, 2 — 4 нед. в темноте, 3 — 2 нед. в темноте, 4 — 3 нед. на свету. а — флуоресценция при 312 нм, б — окрашивание реактивом Драгендорфа; пунктирной линией обведены пятна, окрашиваемые реактивом.

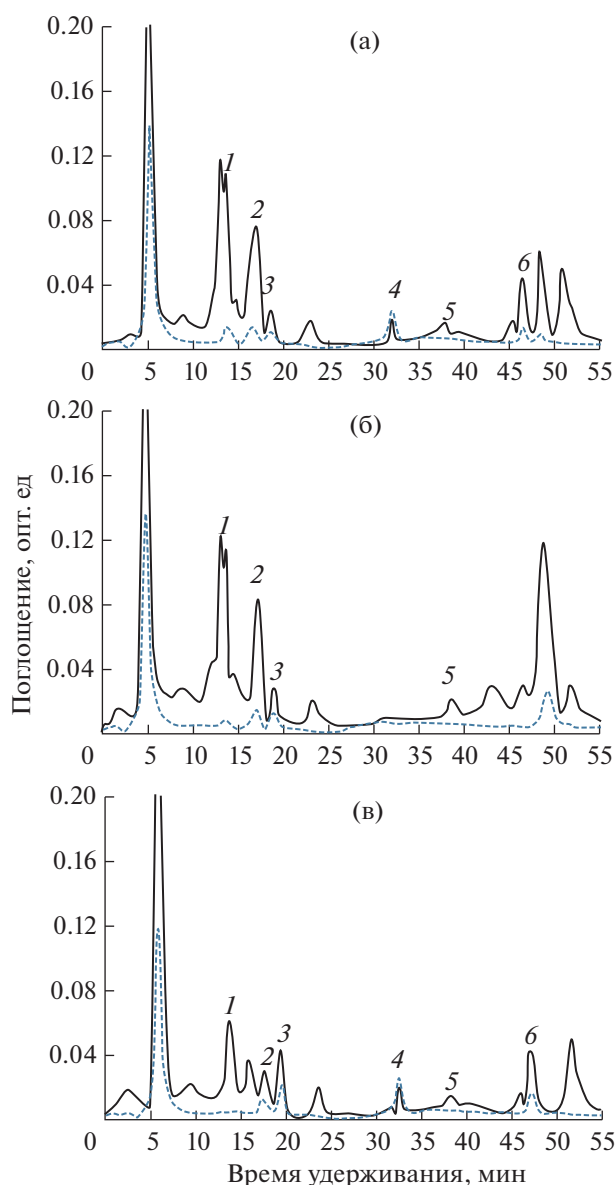


Рис. 7. ВЭЖХ фенольных соединений эмбрионных культур *P. rupifragum*, культивируемых в разных условиях: а – 4 нед. в темноте, б – 2 нед. в темноте, в – 3 нед. на свету (1 – п-кумаровая кислота, 2 – феруловая кислота, 3 – 2,5-дигидроксibenзойная кислота, 4 – кверцетин, 5 – коричная кислота, 6 – кемпферол). Сплошная линия – поглощение при 280 нм, пунктирная линия – поглощение при 360 нм.

пшеницы и камелии [23]. Предположительно, часть веществ, составляющих ПСЭКМ, имеет внутриклеточную природу и накапливается экстраклеточно в результате разрушения и гибели клеток эмбрионидов, переходящих к каллусообразованию. Нами показано, что цикл, включающий образование каллуса и последующее формирование новых эмбрионидов, происходит в базальной части КСЭ, в которой клетки имеют наиболее крупные липофильные включения (рис. 3). Дру-

гая часть компонентов ПСЭКМ является продуктом секреции полисахаридов и гликозилированных белков, являющихся компонентами клеточных стенок и участвующими в их синтезе, или защитными молекулами. Не исключено, что определенная часть соединений, составляющих ПСЭКМ, являются продуктом шелушивания компонентов клеточных стенок в процессе их модификации и, например, растяжения. Вполне возможно, что образование ПСЭКМ на поверхности проэмбрио и глобулярных эмбрионидов обусловлено аномалиями в образовании кутикулярного слоя и клеточных стенок как результат влияния специфических условий культивирования *in vitro*. Одним из факторов, оказывающим наиболее значимое влияние на физиологию и морфогенез растений *in vitro*, является высокая относительная влажность в сосудах культивирования, достигающая 100% [24]. Установлено, что листья растений, культивируемых *in vitro*, имеют кутикулу тоньше, чем листья растений *in vivo* [25, 26], в некоторых случаях кутикула на листьях отсутствует совсем [27]. Показано, что высокая влажность может нарушать полимеризацию кутина и эпикутикулярных восков, влияя на состав и толщину кутикулы [25], ее механические свойства [28] и проницаемость [29]. По мнению Yeung [30] морфология кутикулярного слоя отражает физические и химические условия развития зародыша. Отсутствие кутикулярного слоя в условиях высокой влажности может приводить к разрыхлению структуры и “шелушиванию” слоев клеточных стенок, что мы обнаружили при изучении ультраструктуры клеток эмбрионидов *P. rupifragum* (рис. 2). Возможными функциями ПСЭКМ, образованной полисахаридами, белками и липофильными соединениями, могут быть механическая защита и поддержание водного баланса в клетках проэмбрио и глобулярных зародышей при отсутствии полностью сформированной протодермы и полноценной кутикулы, а также ее определенная организующая функция на ранних этапах дифференцировки соматических зародышей [23]. Можно предполагать, что дефекты в развитии протодермы и кутикулярного слоя находятся в ряду факторов, “запускающих” повторные циклы каллусирования и образования адвентивных эмбрионидов в эмбрионной культуре мака скалоломного на безгормональной среде.

Как уже было отмечено, для эмбрионидов *P. rupifragum* было характерно накопление соединений липофильной природы. Известно, что семена маковых обогащены триацилглицеридами, жирными кислотами, токоферолом, предшественником которого является дитерпен фитол [2]. Синтез и накопление триацилглицеридов были описаны для эмбрионных каллусов *P. somniferum* и *P. orientale* [31]. Аккумуляцию триацилглицеридов у эмбрионидов в этих видах мака на-

блюдали на стадии глобулы. При переносе соматических зародышей на среду регенерации происходило снижение содержания липофильных соединений. По мнению авторов [31] синтезируемые липиды выполняют энергетическую функцию, так как их содержание в клетках значительно снижалось при прорастании зародышей. Необходимо отметить, что липофильные соединения, накапливающиеся в семенах представителей рода *Papaver*, определяют ценность этого растения для пищевой и косметической промышленности [32]. Семена мака богаты как насыщенными (пальмитиновая, стеариновая), так и полиеновыми (линолевая, олеиновая, альфа-линоленовая) жирными кислотами.

Наши гистохимические исследования показали, что в эмбрионной культуре *P. rupifragum* накапливаются не только липиды (преимущественно, в виде триацилглицеридов), но и терпены. Состав терпенов у маковых изучен слабо. В нескольких работах показано, что фитол — наиболее часто встречающийся терпен у маковых [2]. В листьях *P. rhoeas* выявлены терпен-содержащие стероиды и сесквитерпены [33]. Гистохимические исследования прорастающих эмбриоидов *P. rupifragum* показали, что наибольшее накопление липофильных соединений было обнаружено в базальных клетках КСЭ. Увеличение липофильных соединений в основании прорастающего эмбриоида позволяет рассматривать липиды как энергетический материал, необходимый для инициации новых эмбриоидов или, возможно, для инициации корней. Влияние терпенов на процесс корнеобразования, скорее, противоположный, так как показано, что терпены ингибируют прорастание семян и, в первую очередь, развитие корня [34]. Каковы функции терпенов в циклических раундах адвентивного эмбриоидогенеза в культуре *P. rupifragum*, какова их внутриклеточная локализация (пластидная, в пластоглобулах или цитоплазматическая, в липидных тельцах), а также состав, пока неясно, и это является предметом дальнейших исследований.

У представителей рода *Papaver* определено более 170 алкалоидов [2]. Состав алкалоидов варьирует в пределах одного и того же вида и может определяться условиями произрастания, в пределах одного растения — органом, из которого алкалоиды были выделены [2]. Ранее проведенные биохимические исследования растений *P. rupifragum* показали накопление алкалоидов реадина, протопина, реагенина и магнофлорина [35].

Как и для многих видов растений, синтез алкалоидов у представителей семейства маковых происходит в дифференцированных морфогенных культурах [6, 36, 37]. Гистологические исследования дифференцированных и частично дифференцированных (формирующих отдельные трахеиды)

культур *P. somniferum* позволили предположить, что для синтеза определенных алкалоидов необходимы определенные клеточные структуры [13]. Морфин и кодеин в клеточных культурах *P. somniferum* были обнаружены лишь в тех каллусах, в которых дифференцировались элементы проводящей системы — трахеиды. В каллусных культурах *P. bracteatum*, синтезирующих морфин, были обнаружены клетки аналогичные млечникам [5], которые были ассоциированы с трахеидами. При этом, в клеточных культурах *P. bracteatum*, в которых отсутствовала какая-либо дифференцировка, синтезировались только допамин и сангвинарин [5]. Кунах и Кацан показали, что недифференцированные культуры опийного мака не синтезируют морфинаны [38].

Согласно исследованиям Kutchan [5] накопление алкалоидов в тканях мака может происходить не только в специализированных структурах, но и в вакуолях. Было показано, что накопление сангвинарина и допамина в культуре клеток *P. bracteatum* [5] и сангвинарина в культуре клеток *P. somniferum* [15] происходит в вакуолях, а ферменты CYP80B1 и ВВЕ синтеза сангвинарина, и протопина ассоциированы с эндоплазматическим ретикулулом клетки [13, 15].

В проведенном нами гистологическом исследовании семядольных листьев регенерантов *P. rupifragum* дифференцировка млечников была обнаружена вдоль элементов флоэмы проводящих пучков. Были выявлены широкие трубчатые образования, заполненные многочисленными везикулами. Такая структура является характерным признаком сложных млечников [39]. В обзорной работе Nagel с соавт. [39] отмечено, что членистые, сложные млечники формируются из клеток прокамбия и камбия проводящих пучков. Тем не менее, формирование млечников мы наблюдали только в зеленых семядолях эмбриоидов *P. rupifragum*.

Исследование эмбрионной культуры *P. rupifragum* в УФ обнаружило желто-зеленую автофлуоресценцию в вакуолях как в паренхимных клетках каллуса (рис. 5б), так и в отдельных поверхностных клетках разрыхляющихся эмбриоидов (рис. 5г), что может свидетельствовать о накоплении алкалоидов [15]. Аналогичное желто-зеленое свечение в вакуолях клеток в УФ наблюдали в клетках клеточной культуры опийного мака после добавления в среду культивирования элиситора, выделенного из мицелия *Botrytis cinerea* [15]. По мнению исследователей, желто-зеленая автофлуоресценция соответствует алкалоиду сангвинарину. Проведенные нами исследования показали, что количественный и качественный состав ФС и алкалоидов культуры *P. rupifragum* зависит от возраста культуры и ее дифференцировки, регулируемой условиями выращивания (свет, темнота).

Дифференцированная эмбриогенная культура *P. rupifragum* сохраняет способность к формированию эмбриоидов на безгормональной МС-среде в течение длительного времени культивирования и может являться основой для дальнейшей разработки биотехнологических методов получения лекарственных соединений для косметологии и фармакологии.

Известно, что дифференцированные культуры растений способны синтезировать более широкий спектр вторичных соединений в отличие от недифференцированных каллусных и суспензионных культур. Очевидным преимуществом дифференцированных культур также являются их морфологическая и генетическая стабильность в течение длительного времени культивирования [40].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственных заданий, выполняемых КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (№ государственной регистрации 122011800137-0).

Работа была выполнена частично с использованием оборудования ЦКП САЦ ФИЦ КазНЦ РАН (электронный микроскоп “Hitachi 7800”).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fazili M.A., Bashir I., Ahmad M., Yaqoob U., Geelani S.N. *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review // Bulletin of the National Research Centre. 2022. V. 46. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z>
2. Butnariu M.M., Quispe C., Herrera-Bravo J., Pentea M., Sarac I., Küşümli A.S., Özçelik B., Painuli S., Semwal P., Imran M., Gondal T.A., Emamzadeh-Yazdi S., Lapava N., Yousaf Z., Kumar M. et al. Papaver plants: current insights on phytochemical and nutritional composition along with biotechnological applications // Oxidative Medicine and Cellular Longevity / ed. Hussain T. 2022. V. 2022. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2022/2041769>
3. Nessler C.L. Somatic embryogenesis in the opium poppy, *Papaver somniferum* // Physiol. Plant. 1982. V. 55. P. 453. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb04526.x>
4. Kassem M.A., Jacquin A. Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy // J. Biomed. Biotech. 2001. V. 1. P. 70. <https://doi.org/10.1155/S1110724301000237>
5. Kutchan T.M., Ayabe S., Krueger R.J., Coscia E.M., Coscia C.J. Cytodifferentiation and alkaloid accumulation in cultured cells of *Papaver bracteatum* // Plant Cell Reports. 1983. V. 2. P. 281. <https://doi.org/10.1007/BF00270181>
6. Kunakh V.A. *Papaver somniferum* L. and *Papaver bracteatum* Lindl. // Biotech. Med. Plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kiev: Logos, 2005. P. 516.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
8. Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rumyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // PLoS ONE 2017. V. 12. e0173537 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
9. Акулов А.Н., Костюкова Ю.А. Условия культивирования, гистологический и биохимический анализ каллусной культуры солодки *Glycyrrhiza glabra* L. // Цитология. 2021. V. 63. P. 590. <https://doi.org/10.31857/S004137712106002X>
10. Folin O., Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // J. Biol. Chem. 1927. V. 73. P. 627. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84277-6)
11. Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Berlin; New York: Springer, 1996. 384 p.
12. Šamaj J., Bobák M., Blehová A., Krištin J., Auxtová-Šamajová O. Developmental SEM observations on an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea mays* // Protoplasma. 1995. V. 186. P. 45. <https://doi.org/10.1007/BF01276934>
13. Facchini P.J., Bird D.A. Developmental regulation of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures // In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant. 1998. V. 34. P. 69. <https://doi.org/10.1007/BF02823126>
14. Della Rocca G., Papini A., Posarelli I., Barberini S., Tani C., Danti R., Moricca S. Ultrastructure of terpene and polyphenol synthesis in the bark of *Cupressus sempervirens* after *Seiridium cardinale* infection // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.886331>
15. Alcantara J., Bird D.A., Franceschi V.R., Facchini P.J. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 173. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059287>
16. Zhang N., Wang M., Li Y., Zhou M., Wu T., Cheng Z. TLC–MS identification of alkaloids in *Leonuri herba* and *Leonuri fructus* aided by a newly developed universal derivatization reagent optimised by the response surface method // Phytochem. Anal. 2021. V. 32. P. 242. <https://doi.org/10.1002/pca.2970>
17. Sieber P., Schorderet M., Ryser U., Buchala A., Kolatukudy P., Métraux J.-P., Nawrath C. Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 721. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.721>
18. Javelle M., Vernoud V., Rogowsky P.M., Ingram G.C. Epidermis: the formation and functions of a fundamen-

- tal plant tissue // New Phytol. 2011. V. 189. P. 17.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03514.x>
19. Батыгина Т.Б., Виноградова Г.Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян // Онтогенез. 2007. V. 38. № 7. P. 166.
 20. Filonova L.H., Bozhkov P.V., Arnold S. von. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 249.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.249>
 21. Румянцева Н.И. Арабиногалактановые белки: участие в росте и морфогенезе растений // Биохимия. 2005. V. 70. № 10. P. 1301.
 22. Румянцева Н.И., Шамай Й., Энзикат Х.-Ю., Сальников В.В., Балушка Ф., Фолькманн Д. Изменение поверхностной сети экстраклеточного матрикса в процессе циклического воспроизводства проэмбриональных клеточных комплексов в каллусе *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // Докл. Акад. наук. 2003. V. 391. № 1. P. 123.
 23. Konieczny R., Bohdanowicz J., Czaplicki A., Przywara L. Extracellular matrix surface network during plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2005. V. 83. P. 201.
<https://doi.org/10.1007/s11240-005-5771-9>
 24. Hazarika B. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants // Scientia Horticulturae. 2006. V. 108. P. 105.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
 25. Kerstiens G. Effects of low light intensity and high air humidity on morphology and permeability of plant cuticles, with special respect to plants cultured *in vitro* // Physiol. Growth Develop. Plants Cult. / ed. Lumsden P.J., Nicholas J.R., Davies W.J. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. P. 132.
 26. Johansson M., Kronstedt-Robards E., Robards A. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation // Protoplasma. 1992. V. 166. P. 165.
<https://doi.org/10.1007/BF01322779>
 27. Wetzstein H., Sommer H. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization // Amer. J. Bot. 1982. V. 69. P. 1579.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1982.tb13411.x>
 28. Matas A., Lopez-Casado G., Cuartero J., Heredia A. Relative humidity and temperature modify the mechanical properties of isolated tomato fruit cuticles // Amer. J. Bot. 2005. V. 92. P. 462.
<https://doi.org/10.3732/ajb.92.3.462>
 29. Schreiber L., Skrabs M., Hartmann K., Diamantopoulos P., Simanova E., Santrucek J. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks // Planta. 2001. V. 214. P. 274.
<https://doi.org/10.1007/s004250100615>
 30. Yeung E. The orchid embryo – “an embryonic protocorm” // Botany. 2022. V. 100. P. 691.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2022-0017>
 31. Schuchmann R., Wellmann E. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism // Plant Cell Reports. 1983. V. 2. P. 88.
<https://doi.org/10.1007/BF00270173>
 32. Lančaričová A., Havrlentová M., Muchová D., Bednářová A. Oil content and fatty acids composition of poppy seeds cultivated in two localities of Slovakia // Agriculture (Polnohospodárstvo). 2016. V. 62. P. 19.
<https://doi.org/10.1515/agri-2016-0003>
 33. Christodoulakis N., Tsiarta M., Fasseas C. Leaf structure and histochemical investigation in *Papaver rhoeas* L. (Corn Poppy, Field Poppy) // J. Herbs, Spices Med. Plants. 2013. V. 19. P. 119.
<https://doi.org/10.1080/10496475.2012.755942>
 34. Singh H., Batish D., Kaur S., Arora K., Kohli K. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots // Ann. Bot. 2006. V. 98. P. 1261.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcl213>
 35. Slavíková L., Slavík J. Alkaloids from *Papaver rupifragum* BOISS. & REUT. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1980. V. 45. P. 761.
<https://doi.org/10.1135/cccc19800761>
 36. Galewsky S., Nessler C. Synthesis of morphinan alkaloids during opium poppy somatic embryogenesis // Plant Sci. 1986. V. 45. P. 215.
[https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90142-1)
 37. Kamo K., Mahlberg P. Morphinan alkaloids: biosynthesis in plant (*Papaver* spp.) tissue cultures // Medic. Aromat. Plants I / ed. Bajaj Y.P.S. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988. V. 4. P. 251.
 38. Кунах В.А., Кацан В.А. Биосинтез изохинолиновых алкалоидов мака в природе и культуре *in vitro* 1. Мак снотворный *Papaver bracteatum* L. // Укр. биохим. ж. 2003. V. 75. № 5. P. 41.
 39. Hagel J., Yeung E., Facchini P. Got milk? The secret life of laticifers: 12 // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 631.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.005>
 40. Krasteva G., Georgiev V., Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods // Engin. Life Sci. 2021. V. 21. P. 68.
<https://doi.org/10.1002/elsc.202000078>

УДК 581.1577.1547.91581.19

ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЦВЕТКАХ И ЛИСТЬЯХ *Achillea asiatica* SERG. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕГИОНА ПРОИЗРАСТАНИЯ¹

© 2023 г. В. П. Курченко^{а, *}, Н. В. Сушинская^а, Е. В. Чудновская^а, Е. И. Тарун^а, П. С. Шабуня^б,
А. Д. Лодыгин^с, И. А. Хрусталева^д, А. Н. Куприянов^д

^аБелорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

^бИнститут биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

^сСеверо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Российская Федерация

^дКузбасский Ботанический сад, Кемерово, Российская Федерация

*e-mail: kurchenko@tut.by

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.

После доработки 14.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Проведено сравнительное исследование состава биологически активных веществ метанольных экстрактов из цветков и листьев *Achillea asiatica* Serg. аборигенной флоры Сибири и Казахстана, произрастающих в различных регионах России (Кемерово, Хакасия) и Казахстана. Использование газовой хроматографии с масс-спектрометрией для анализа экстрактов из цветков и листьев показало, что существуют значительные отличия в составе и содержании моно-, сескви- и кислородсодержащих терпеноидных соединений, которые связаны с регионом произрастания. Антиоксидантная активность экстрактов из цветков *A. asiatica* исследованных образцов значительно выше, чем в экстрактах из листьев. Эффективность антиоксидантного действия экстрактов определяется преимущественно фенольными соединениями, которые не относятся к терпенам. Проведенные фитохимические исследования трех образцов *A. asiatica* из различных регионов произрастания показали значительную изменчивость состава биологически активных веществ и их антиоксидантной активности. При заготовке лекарственного сырья это может привести к различной фармацевтической активности травы *A. asiatica*.

Ключевые слова: *Achillea asiatica*, антиоксидантная активность, ГЖХ-МС, монотерпены, сесквитерпены, стероиды, терпеноиды

DOI: 10.31857/S0015330323601139, **EDN:** ZQTYVN

ВВЕДЕНИЕ

Род *Achillea* L. (Asteraceae), представлен более 140 видами многолетних травянистых растений, распространенных преимущественно в Северном полушарии. Виды *Achillea* используются в народной медицине для многочисленных медицинских применений [1]. Некоторые виды этого рода прошли обширные фитохимические исследования, что позволило применять препараты на их основе в официальной медицине [2, 3]. Эти препараты находят терапевтическое применение, как противовоспалительные [3, 4], ранозаживляющие [5, 6], спазмолитическое и гепатопротекторное [7–9]. Их применение основано на различных биологически активных веществах (БАВ) экстрагируемых

из травы *Achillea*: моно- и сесквитерпенов, терпеноидов, флавоноидов, флавонолов, и других [10–12]. Для использования в фармацевтике ведутся работы по выявлению новых форм и видов *Achillea* с высоким содержанием БАВ [13–19]. Большой интерес для получения БАВ представляют эндемические виды *Achillea*, произрастающие в различных регионах Казахстана и Сибири для которых ранее не проводились фитохимические исследования [20].

Среди различных видов тысячелистников важное значение имеет тысячелистник азиатский (*Achillea asiatica* Serg), который был выделен в самостоятельный вид из тысячелистника обыкновенного (*A. millefolium* L.). Наравне с этим видом травы *A. asiatica* используется при почечнокаменной болезни, воспалительных гинекологических заболеваниях, а также в качестве противосудорожного средства [7, 18, 19, 21]. В зависи-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323601139 для авторизованных пользователей.

Таблица 1. Места сбора и каталожные номера образцов тысячелистника азиатского (*A. asiatica*) в гербарии Кузбасского ботанического сада

Каталожный № гербария	Вид	Место сбора
1	2	3
KUZ KEM 16466	Тысячелистник азиатский (<i>A. asiatica</i> Serg. Кемерово, Россия)	Россия, Кемеровская область, Беловский район, окрестности с. Каракан (54.353912° с.ш., 86.77906° в.д.)
KUZ SIB	Тысячелистник азиатский (<i>A. asiatica</i> Serg. Хакасия, Россия)	Россия, Хакасия, Орджоникидзевский район, окр.оз. Сульфатное (54°58'40" с.ш., 89°36'35" в.д.)
KUZ KAZ 06526	Тысячелистник азиатский (<i>A. asiatica</i> Serg. Казахстан)	Казахстан, Восточно-Казахстанская область, Зайсанский район, хребет Саур (47.43306° с.ш., 85.27296° в.д., А = 669 м.)

мости от региона произрастания состав БАВ входящих в экстракт травы *A. asiatica* может различаться. Эти внутривидовые различия состава вторичных метаболитов могут быть связаны с регионом произрастания и климатическими условиями.

В связи с этим, представлялось целесообразным провести сравнительное исследование состава БАВ экстрактов из листьев и цветков *A. asiatica*, произрастающих в различных регионах. Этот вид распространен в Казахстане, Новосибирской, Кемеровской областях, Республике Хакасия и других регионах Сибири, Дальнего Востока, Монголии. Кроме этого, важно исследовать антиоксидантную активность полученных экстрактов, для определения возможности их дальнейшего использования.

Целью работы являлось проведение сравнительного исследования состава БАВ экстрактов из листьев и цветков *A. asiatica* из различных удаленных регионов произрастания Кемеровской области, Хакасии, Казахстана для выявления внутривидовых различий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись метанольные экстракты цветков и листьев тысячелистника азиатского (*A. asiatica*), собранных в России и Казахстане (табл. 1). Образцы растений собраны в период цветения летом 2017 г., определены сотрудниками Кузбасского ботанического сада и депонированы в его гербарии.

Приготовление проб для анализа. Для приготовления экстрактов использовались три экземпляра тысячелистника из каждого региона произрастания. Цветки и листья измельчали и пропускали через сито с диаметром 0.5 мм. Из измельченных цветков и листьев вещества экстрагировались метанолом в соотношении 1 : 10 (м/об). Время экстракции 2 ч при температуре 25°C. Для использования в дальнейших исследованиях экс-

тракты пропускали через фильтр 0.22 мкм Millipore ("Millipore", США). После удаления метанола на ротормном испарителе определялось содержание сухого остатка, которое составило для всех исследованных образцов 15.0–16.2 мг/мл.

ГЖХ-МС анализ. Исследование состава биологически активных веществ экстрактов проводили с использованием хромато-масс-спектрометрической системы: газовый хроматограф Agilent 6850 ("Agilent", США) с масс-селективным детектором Agilent 5975B ("Agilent", США) (ГЖХ-МС). Для анализа использовалась капиллярная колонка DB-5MS (5% Phenyl Methyl Siloxane, J&W 122–5062) ("Agilent", США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм. Температура инжектора 300°C, температура интерфейса 300°C. Газ-носитель – гелий, объемная скорость газ-носителя – 1 мл/мин. Температурная программа: начальная температура термостата 35°C, подъем температуры со скоростью 5°C/мин до 170°C (изотермический режим в течение 7 мин); подъем температуры со скоростью 7°C/мин до 280°C (изотермический режим в течение 10 мин). Время анализа 59.71 мин. Объем пробы 1 мкл, ввод пробы со сбросом 70 : 1. Параметры масс-детектора: температура источника 230°C, температура квадруполя 150°C. Идентификацию компонентов проводили по масс-спектрам с использованием библиотеки масс-спектров NIST. С использованием программного обеспечения хромато-масс-спектрометрической системы, по площадям пиков рассчитывали относительное содержание индивидуальных соединений в % от общей площади пиков индивидуальных веществ в хроматографическом профиле ГЖХ-МС исследованных образцов [20].

Определение антиоксидантной активности. Для оценки антиоксидантной активности (АОА) метанольных экстрактов цветков и листьев применяли флуориметрический метод ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) [22]. Метод основан

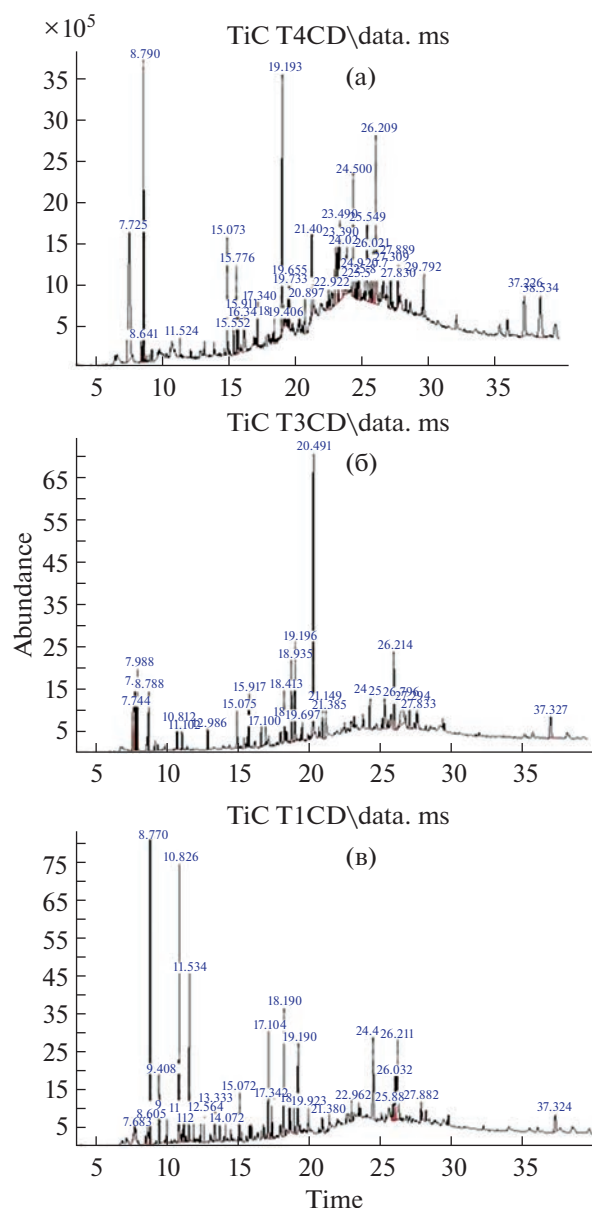


Рис. 1. Хроматографические профили ГХ-МС метанольных экстрактов из цветков *A. asiatica*, произрастающих в Кемерово (а), Хакасии (б) и Казахстане (в).

на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ) при его взаимодействии с кислородными радикалами. Антиоксиданты в реакционной среде, взаимодействуя с кислородсодержащими радикалами, замедляют свободнорадикальное окисление ФЛ. Определяли АОО веществ, входящих в экстракты, оценивали по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC (“Shimadzu”, Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения — 490 нм.

Расчет показателей ОАО проводили по степени интенсивности флуоресценции (A , %), рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{F_1}{F_0} \times 100,$$

где F_0 — интенсивность флуоресценции контрольного образца ФЛ (раствор ФЛ без Fe^{2+} , ЭДТА, гидролизата и H_2O_2), F_1 — интенсивность флуоресценции раствора после добавления экстракта.

Строили графики зависимости интенсивности флуоресценции (A , %) от содержания экстракта цветков и листьев. Согласно полученному уравнению, рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50% ингибированию флуоресценции. Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы “Microsoft Office Excel 2003” (“Microsoft Corporation”, США). Результаты независимых экспериментов представлены как среднее арифметическое значение. Достоверность различий между выборками данных определяли методом доверительных интервалов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В медицинской практике широко используются экстракты из травы *A. asiatica*. В их состав входят различные по структуре и свойствам БАВ, которые содержатся в цветах и листьях. В связи с этим проведено сравнительное исследование состава и содержания БАВ метанольных экстрактов цветков и листьев *A. asiatica*, собранных в районах Казахстана, Хакасии и Кемеровской области РФ. При исследовании состава БАВ экстрактов из цветков использовался ГХ-МС анализ. На рис. 1 представлены хроматографические профили исследованных образцов метанольных экстрактов цветков из различных регионов произрастания.

По результатам ГХ-МС анализа в экстрактах из цветков обнаружено 33 различных по структуре БАВ. Относительное содержание основных БАВ в метанольных экстрактах цветков исследованных тысячелистников представлено в таблице S1 (Дополнительные материалы, табл. S1).

Анализ результатов показывает, что существуют значительные отличия в составе и содержании вторичных метаболитов в цветках *A. asiatica*, которые связаны с регионом произрастания. Так, монотерпеновые соединения *A. asiatica* образца из Кемерово представлены — сабиеном, из Хакасии — пиненом, а Казахстана — цименом. Сесквитерпен β -кариофиллен содержится в трех исследованных образцах, а гермакрен-D только в образцах из Кемерово и Хакасии. Наиболее существенные различия БАВ исследованных образцов связаны с составом терпеноидных соеди-

нений: цинеола, цис- β -терпинеола, камфоры, борнеокамфора, α -терпинеола, β -кариофилленоксида, β -эвдесмола, α -бисаболола, лимонен оксида, артемисина, β -амирина. При этом суммарное содержание терпеноидов для образцов из Кемерово, Хакасии и Казахстана значительно различалось и составило 16.3%, 10.2% и 55.7%, соответственно, от общего содержания идентифицированных веществ. Образцы так же содержали алифатические соединения: Кемерово – 18.7%, Хакасия – 14.7% и Казахстан – 9.5%, а также γ -ситостерол. Для исследованных образцов характерно содержание только двух общих соединений: цинеола и γ -ситостерола.

Значительные различия в составе и содержании БАВ в экстрактах цветков *A. asiatica* из удаленных регионов произрастания проявились и в их антиоксидантных свойствах. С использованием флуориметрического метода ORAC показано, что максимальную АОА проявлял экстракт из цветков образца из Кемерово. При анализе интенсивности флуоресценции, соответствующей максимальному ингибированию свободных радикалов ($A_{\max}$) этот экстракт проявлял максимальную интенсивность. При этом для ее достижения концентрация экстракта ($C_{\max}$) была одинаковой для всех исследованных образцов. Концентрация экстракта образца из Кемерово, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов (IC_{50}), была минимальной и составила $0.47 \times 10^{-3}\%$. В зависимости от региона произрастания существуют значительные внутривидовые отличия АОА исследованных экстрактов цветков. По показателю IC_{50} экстракты из цветков *A. asiatica*, собранных в Хакасии и Казахстане в 4.6 раза и 7.7 раза соответственно выше, чем у образца из Кемерово. Это свидетельствует об их низкой антиоксидантной активности. Внутривидовые различия АОА экстрактов цветков *A. asiatica* могут быть связаны с химической изменчивостью состава БАВ в зависимости от региона произрастания.

Результаты разделения БАВ из экстрактов листьев, исследованных образцов, произрастающих в различных регионах, представлены на ГХ-МС хроматограммах (рис. 2).

Исследование с использованием ГХ-МС состава и содержания БАВ метанольных экстрактов листьев *A. asiatica*, собранных в районах Казахстана, Хакасии и Кемеровской области РФ выявило в них 44 различных соединения. При близком содержании суммы экстрактивных веществ в экстрактах листьев исследованных тысячелистников, относительное содержание основных индивидуальных БАВ представлено в таблице S2 (Дополнительные материалы, табл. S2).

В зависимости от региона произрастания состав и содержание БАВ в листьях *A. asiatica* значи-

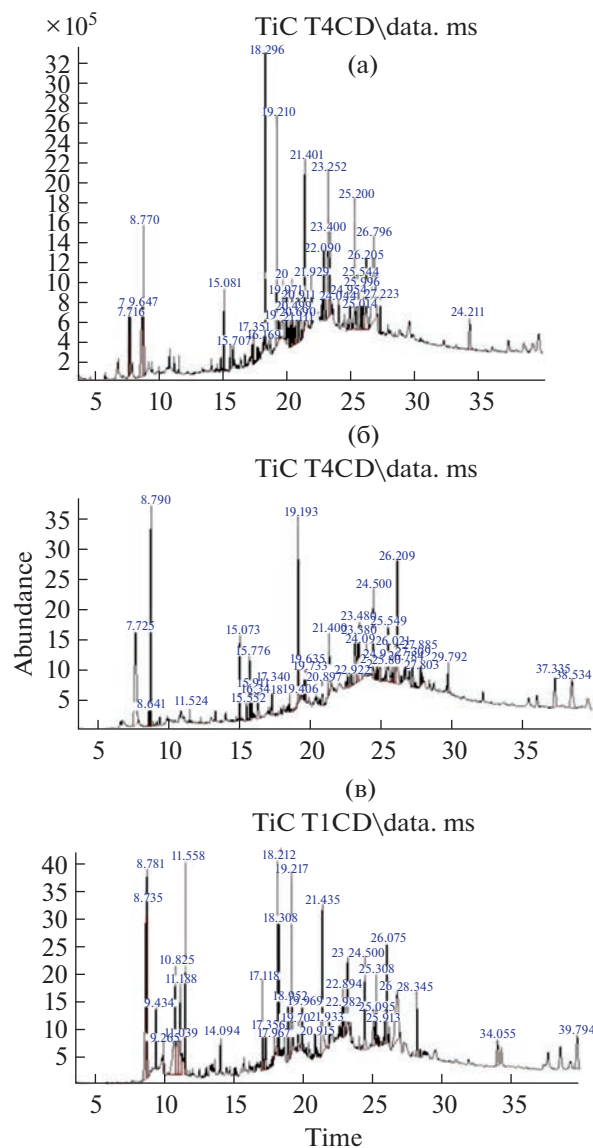


Рис. 2. Хроматографические профили ГХ-МС метанольных экстрактов из листьев *A. asiatica*, произрастающих в Кемерово (а), Хакасии (б) и Казахстане (в).

тельно отличаются. Монотерпеновые соединения *A. asiatica* из Кемерово представлены сабином, β -пиненом; из Хакасии β -пиненом, мерценом, лимоненом; а из Казахстана содержит только α -оцимен. Сесквитерпен β -кариофиллен не содержится в образце из Казахстана. Наиболее существенные различия БАВ исследованных образцов связаны с изменчивостью состава кислородсодержащих монотерпенов и сесквитерпенов. Для образца из Кемерово характерно наличие цинеола, сесквисабинен гидрата, β -кариофилленоксида, лолиолида, аустрицина. Образец тысячелистника из Хакасии содержит в экстракте из листьев терпениолы: цинеол, камфору, борнеокамфор, борнилацетат, бисаболол. Экстракт из листьев образца из Кемерово содержал терпинеол,

Таблица 2. Содержание различных классов терпеновых соединений в экстрактах из цветков и листьев образцов *A. asiatica* из Кемерово, Хакасии и Казахстана

Класс соединений	Суммарное содержание терпеновых соединений от общего содержания БАВ в метанольных экстрактах, %	
	цветки	листья
<i>A. asiatica</i> из Кемерово		
Монотерпены	12.9	5.01
Кислородсодержащие монотерпены	6.39	11.14
Сесквитерпены	7.85	2.09
Кислородсодержащие сесквитерпены	1.27	0.99
<i>A. asiatica</i> из Хакасии		
Монотерпены	13.08	12.75
Кислородсодержащие монотерпены	7.29	12.03
Сесквитерпены	4.79	1.42
Кислородсодержащие сесквитерпены	2.94	1.80
<i>A. asiatica</i> из Казахстана		
Монотерпены	2.19	3.60
Кислородсодержащие монотерпены	42.08	34.55
Сесквитерпены	2.02	—
Кислородсодержащие сесквитерпены	8.64	6.27

цинеол, камфору, борнеокамфор, цис- β -терпинеол, α -терпинеол, сесквисабинен гидрат, β -кариофилленоксид, β -эвдесмол, лолиолд, артемисин, сальвигенин.

Суммарное содержание терпеновых соединений для форм из Кемерово, Хакасии и Казахстана различалось и составило соответственно 42.4, 44.0 и 53.4% от общего содержания идентифицированных веществ. В исследованных образцах содержались алифатические соединения: Кемерово 30.2%, Хакасия 11.8% и Казахстан 27.0%. В экстракте из листьев α -амирин содержался только в образце из Казахстана.

Исследование АОА экстрактов из листьев *A. asiatica* показало, что их активность в десять раз меньше, чем у экстрактов из цветков. Концентрация экстрактов образцов из Кемерово, Хакасии и Казахстана, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов (IC_{50}), составила $2.6 \times 10^{-2}\%$; $1.0 \times 10^{-2}\%$; $1.0 \times 10^{-2}\%$, соответственно. Это свидетельствует о низкой антиоксидантной активности экстрактов из листьев и незначительных внутривидовых различиях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как установлено в результате газохроматографического анализа экстрактов из цветков и листьев, всем изученным образцам *A. asiatica* из Кемерово, Хакасии и Казахстана присущ ограниченный спектр структурных типов соединений

терпеновой природы. Идентифицированные соединения были разделены на несколько классов, включая монотерпены, сесквитерпены, кислородсодержащие монотерпены и кислородсодержащие сесквитерпены. Общее содержание соединений, входящих в эти классы для исследованных образцов цветков и листьев из различных регионов произрастания, представленных в табл. 2.

Анализ результатов, представленных в табл. 2, показывает, что в составе экстрактов образца *A. asiatica* из Казахстана содержится значительное количество кислородсодержащих моно- и сесквитерпенов, которое составило для цветков 50.7 и 40.8% для листьев. Эти показатели для образца из Кемерово были значительно меньше и составили для цветков 7.6 и 2.1% для листьев, а для образца из Хакасии для цветков 10.2% и для листьев 13.8%. Кроме различий суммарного содержания терпеновых соединений в цветках и листьях исследованных форм они значительно различаются составом моно- и сесквитерпенов.

Монотерпеновые соединения в экстракте из цветков образца *A. asiatica* из Кемерово содержат только бициклический монотерпен — сабинен 12.9%, а листья — сабинен 2.5% и L- β -пинен 2.5%. Монотерпеновые кислородсодержащие соединения представлены бициклическим эфиром — цинеолом в цветках 6.4%, а в листьях 11.1%.

В состав экстракта из цветков *A. asiatica* образца из Хакасии входит только бициклический монотерпен β -пинен 13.1%, а в листьях алифатиче-

ский монотерпен мирцен 1.3%, моноциклический — лимонен 3.0% и бициклический β -пинен 8.5%. Состав терпеноидных кислородсодержащих соединений этого образца более разнообразен. Цветы содержат моноциклический эфир лимонен оксид 2.4% и бициклический эфир цинеол 2.7%, бициклический альдегид — камфору 1.2% и бициклический спирт — борнеокамфор 1.0%. Листья содержат цинеол 6.2%, камфора 3.7%, борнеокамфор 2.1%.

Образец тысячелистника из Казахстана в экстракте из цветков содержит только моноциклический О-цимен 2.2%, а в листьях алифатический α -оцимен 3.6% и значительное количество кислородсодержащих терпеноидных соединений. В экстракте из цветков входят: бициклический эфир цинеол 13.3%, бициклический кетон — камфора 13.6%, бициклические спирты — борнеокамфор 1.7%, транс-3(10)-Карен-2-ол 2.3% и моноциклические спирты — α -терпинеол 7.1%, β -терпинеол 4.1%. В экстракте из листьев содержатся: бициклический эфир — цинеол 15.9%, бициклический кетон — камфора 7.1%, бициклические спирты — борнеокамфор 4.2% и моноциклические спирты — α -терпинеол 5.2%, β -терпинеол 2.2%.

Биосинтез терпеновых соединений в цветах и листьях исследованных образцов *A. asiatica* является сложным многостадийным ферментативным процессом. При синтезе ациклических монотерпенов, таких как мирцен, происходит процесс депротоинизации карбокатионов геранилдифосфата или линалилдифосфата. Стадия изомеризации геранилдифосфата в линалилдифосфат приводит к биосинтезу циклических монотерпенов, таких как лимонен или пинены [23, 24]. Многие монотерпеновые синтетазы катализируют образование нескольких продуктов, включая ациклические, моноциклические и бициклические структуры [25]. В образцах тысячелистника из Хакасии и Казахстана в экстрактах присутствует бициклический кетон — камфора, биосинтез которой осуществляют (-)-пиненциклазы [24]. Состав БАВ исследованных образцов *A. asiatica* свидетельствует о различных механизмах их биосинтеза в зависимости от региона произрастания.

Сесквитерпеновые соединения в экстракте из цветков образца *A. asiatica* из Кемерово представлены моноциклическими: гермакреном D 1.1%, α -куркуменом 2.1%, β -сесквифелландреном 1.9% и бициклическим: β -кариофилленом 2.7%. В экстракте из листьев содержится бициклический сесквитерпен: β -кариофиллен 2.1%. В состав терпеноидных соединений этого образца входит бициклический эфир β -кариофилленоксид 1.0%.

В экстракте из цветков образца *A. asiatica* Хакасии представлены моноциклическими сесквитерпенами: гермакреном D 2.8% и бициклическим: β -кариофилленом 2.0%. В экстракте из листьев со-

держится только бициклический сесквитерпен: β -кариофиллен 1.4%. В состав кислородсодержащих сесквитерпеновых соединений листья и цветы содержат моноциклический спирт α -бисаболол.

Экстракт цветков образца *A. asiatica* из Казахстана содержит бициклический сесквитерпен- β -кариофиллен 2.0%. В листьях этого образца не содержатся сесквитерпены. В составе кислородсодержащих сесквитерпеновых соединений цветы содержат бициклические β -кариофилленоксид 1.9% и β -эвдесмол 6.8%, а листья β -кариофилленоксид 1.3% и β -эвдесмол 4.9%.

Выявленные различия в составе и содержании терпеновых соединений образцов *A. asiatica* из Кемерово, Хакасии и Казахстана могут являться следствием ряда факторов, таких как климатические условия, высота произрастания, питательные вещества и др. В связи со значительными отличиями в составе БАВ и сложных путях их биосинтеза, удаленностью произрастания исследованных образцов нельзя исключить возможность процесса формирования хеомасс *A. asiatica*. Это предположение требует дополнительных исследований.

Антиоксидантные свойства экстрактов из цветков и листьев исследованных образцов *A. asiatica* значительно различаются. Эти отличия не связаны с количеством терпеновых соединений, а определяются преимущественно составом фенольных соединений.

Проведенные фитохимические исследования экстрактов тысячелистников исследованных образцов *A. asiatica* из различных регионов произрастания показали значительную изменчивость состава БАВ и их антиоксидантной активности. На практике при заготовке лекарственного сырья это может привести к различной фармацевтической активности травы *A. asiatica*, которая используется для травяных чаев при их терапевтическом применении.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turkmenoglu F.P., Agar O.T., Akaydin G., Hayran M., Demirci B. Characterization of the volatile compounds of eleven *Achillea* species essential oils from Turkey and biological activities of the essential oil and methanol extract of *A. hamzaoglui* Arabacı & Budak // *Molecules*. 2015. V. 20. P. 11432. <https://doi.org/10.3390/molecules200611432>
2. Yaeesh S., Jamal Q., Khan A.U., Gilani A.H. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium* // *Phytother*. 2006. V. 20. P. 546. <https://doi.org/10.1002/ptr.1897>

3. Zengin G., Bulut G., Mollica A., Haznedaroglu M.Z., Dogan A., Aktumsek A. Bioactivities of *Achillea phrygia* and *Bupleurum croceum* based on the composition of phenolic compounds: In vitro and in silico approaches // Food. Chem. Toxicol. 2017. V. 107. P. 597. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.037>
4. Nemeth E., Bernath J. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.) // Curr. Pharm. Des. 2008. V. 14. P. 3151. <https://doi.org/10.2174/138161208786404281>
5. Nikolova M., Vitkova A., Gesheva E. Comparison of flavonoid profiles of cultivated plants of *Achillea asplenifolia*, *Achillea collina* and cultivar "Proa" // Biologica Nyssana. 2013. V. 4. P. 65.
6. Ghasemi P.A., Koohpayeh A., Karimi I. Effect of natural remedies on dead space wound healing in wistar rats // Pharmacogn. Mag. 2009. V. 5. P. 433.
7. Yaeesh S., Jamal Q., Khan A.U., Gilani A.H. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium* // Phytother. 2006. V. 20. P. 546. <https://doi.org/10.1002/ptr.1897>
8. Karamenderes C., Apaydin S. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bässler on the rat isolated duodenum // J. Ethnopharmacol. 2003. V. 84. P. 175. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00296-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00296-9)
9. Temamogullari F., Hayat A., Bab F. Effects of yarrow extract on wound healing in rabbits // J. Anim. Vet. Adv. 2009. V. 8. P. 1204.
10. Akkol K.E., Koca U., Pesin İ., Yilmazer D. Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by in vivo excision and incision models // J. Evid Based Complement. Altern. Med. 2011. P. 7. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep039>
11. Serdar G., Sökme M., Bektaş E. Extraction of antioxidative principles of *Achillea biserrata* M. Bieb. and chromatographic analyses // Intern. J. Secon. Metab. 2015. V. 2. P. 3.
12. Tarek F.E., Gonzalez-Burgos E., Gomez-Serranillos M.P. Chemical characterization of polyphenols of egyptian *Achillea fragrantissima* with in vitro antioxidant study // Chiang Mai J. Sci. 2018. V. 45. P. 897.
13. Agar O.T., Dikmen M., Turkmenoglu F.P. Comparative studies on phenolic composition, antioxidant, wound healing and cytotoxic activities of selected *Achillea* L. species growing in Turkey // Molecules. 2015. V. 20. P. 17976. <https://doi.org/10.3390/molecules201017976>
14. Saeidnia S., Gohari A.R., Mokhber-Dezfuli N., Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea* // DARU J. Pharm. Sci. 2011. V. 19. P. 173.
15. Taşkın D., Taşkın T., Rayaman E. Phenolic composition and biological properties of *Achillea nobilis* L. subsp. *neilreichii* (Kerner) Formanek // Ind. Crops. Prod. 2018. V. 111. P. 555 <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.11.022>
16. Trendafilova A., Todorova M., Duddeck H. Flavonoids in flower heads of three *Achillea* species belonging to *Achillea millefolium* group // Chem. Nat. Comp. 2007. V. 43. P. 212. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0082-5>
17. Vitalini S., Beretta G., Fico G. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity // Acta Biochim. 2011. V. 58. P. 203.
18. Bobis O., Dezmiorean D.S., Tomos L., Chirila F., Marghitas Al.L. Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against gram-positive and gram-negative bacteria // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 113.
19. Hosseini M.M., Sarker S.D., Akbarzadeh A. Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities // J. Ethnopharmacol. 2017. V. 199. P. 257. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.010>
20. Kurchenko V., Sushinskaya N., Maiorava K., Tarun E., Kupriyanov A. Composition of biologically active substances of flower extracts from a variety of *Achillea* species and their antioxidant properties // ICAETT 2021, Lecture Notes in Networks and Systems; Eds. V. Kurchenko et al.: Springer Nature Switzerland AG. 2022. V. 408. P. 81. https://doi.org/10.1007/978-3-030-96641-6_10
21. Thoppil R.J., Harlev E., Bishayee A. Antitumor activities of extracts from selected desert plants against HepG2 human hepatocellular carcinoma cells // Pharm. Biol. 2013. V. 51. P. 668 <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.749922>
22. Tarun E.I.K., Zaitseva M.V., Kravtsova O.I., Kurchenko V.P., Halavach T.M. Influence of peptides of whey proteins of milk on the restoration of the level of fluorescence in the system with activated forms of oxygen // Proceed. Belarus. S.U. 2016. V. 11. P. 231.
23. Croteau R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids // Chem. Rev. 1987. V. 87. P. 929. <https://doi.org/10.1021/CR00081A004>
24. Gijzen M., Lewinsoh E., Croteau R. Characterization of the constitutive and wound-inducible monoterpene cyclases of grand fir (*Abies grandis*) // Archiv. Biochem. Biophys. 1991. V. 289. P. 267. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90471-t](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90471-t)
25. Wagschal K., Savage T.J., Croteau R. Isotopically sensitive branching as a tool for evaluating multiple product formation by monoterpene cyclases // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 5933.

УДК 581.1

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ РАСТЕНИЙ *BIDENS TRIPARTITA* (L.) И *BIDENS PILOSA* (L.) ИЗ РАЗНЫХ МЕСТ ОБИТАНИЯ

© 2023 г. Э. Бименьиндавы^а*, Л. З. Хуснетдинова^а, О. А. Тимофеева^а

^аКазанский федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: efredence@gmail.com

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

Bidens tripartita L. и *Bidens pilosa* L. являются потенциальными источниками биологически активных веществ, обладающих противомикробной, антидиабетической, противораковой, противовоспалительной, антиоксидантной и другими активностями. Данные виды череды широко используются в разных странах в фитомедицине. Установлено, что изучаемые виды богаты разнообразными фенольными соединениями, причем растения, произрастающие в условиях умеренно-континентального (Татарстан) и тропического (Бурунди) климата, слабо различаются по содержанию фенольных соединений, что свидетельствует о генетически обусловленной узкой амплитуде изменчивости метаболизма этих видов. Качественный анализ фенольных соединений показал, что изученные виды растений синтезируют определенные группы соединений для адаптации в конкретных условиях обитания. Киримиру в Республике Бурунди и Спасский район в Республике Татарстан можно рассматривать как перспективные районы для выращивания и сбора изучаемых видов растений. Температура, высота над уровнем моря, количество осадков и состав почвы являются ключевыми факторами, влияющими на содержание фенольных соединений растений *B. pilosa* и *B. tripartita*.

Ключевые слова: *Bidens pilosa* (L.), *Bidens tripartita* (L.), состав почв, температура, фенольные соединения

DOI: 10.31857/S001533032360081X, **EDN:** BGLVUR

ВВЕДЕНИЕ

Bidens — один из родов семейства астровых (Asteraceae), включающий в себя около 280 видов, в том числе, *B. tripartita* и *B. pilosa*. Виды *Bidens* широко используются в народной и традиционной медицине для лечения различных заболеваний в разных странах мира.

Согласно литературным данным, растения рода *Bidens* содержат множество соединений, включая флавоноиды, фенилпропаноиды, тритерпеноиды, алкалоиды и органические кислоты, из которых флавоноиды являются основными эффективными компонентами [1].

Современные фармакологические исследования показывают, что именно эти соединения в растениях *Bidens* обладают противовоспалительными, антиоксидантными, обезболивающими, антибактериальными, противоопухолевыми, гиполипидемическими, антидиабетическими, гепротекторными функциями [2].

В свою очередь, в растениях основной функцией вторичных метаболитов является защита от

неблагоприятного воздействия различных факторов абиотической и биотической природы в течение всей жизни, обеспечивая, таким образом, приспособленность и выживание растений [3, 4]. Чтобы справиться со стрессом, растения вынуждены индуцировать или уменьшать синтез вторичных метаболитов в организме [5]. Различные исследования свидетельствуют о значительном влиянии отдельных факторов окружающей среды на накопление веществ вторичного метаболизма растений. Например, показано, что засуха вызывает окислительный стресс, при этом увеличиваются фенольные соединения и витамины в *Amaranthus tricolor* L. [6]. Повышенные температуры и высокая интенсивность света увеличивают синтез и накопление различных вторичных метаболитов, включая кверцетин, дубильные вещества, аскорбиновую кислоту, тритерпеноиды, многие из которых обладают антиоксидантными свойствами [7].

В связи с этим состав и количество биологически активных веществ, характеризующих эффективность лекарственных растений, различают в зависимости от вида и органа растения, срока сбора и условий места обитания (климатические

Сокращения: ВРФ — водорастворимые фенольные соединения, РБ — Республика Бурунди, РТ — Республика Татарстан.

Таблица 1. Гео-экологические характеристики районов региона Кирими́ро, Мугамба и Бурагане (среднегодовые за 2019 г.)

Район	Высота над уровнем моря, (м)	Количество осадков, (мм)	Средняя температура, (°C)	pH	Содержание минеральных элементов в почвах исследуемых регионов				
					NO ₃ ⁻ (%)	PO ₄ ³⁻ (мд)	K ⁺ (мЭкв/ 100 г)	Ca ²⁺ (мЭкв/ 100 г)	Mg ²⁺ (мЭкв/100 г)
Кирими́ро	1603	1321	19	4.9	0.13	5.94	0.36	4.7	0.63
Мугамба	2097	1598	15.7	4.0	0.11	7.56	0.24	0.45	0.19
Бурагане	1550	1233	21.5	5.7	0.19	8.45	0.57	3.44	0.58

Таблица 2. Ландшафтные и климатические (осенне-весенний период 2019 г.) характеристики районов Татарстана. <https://nuipogoda.ru/>

Район	Количество осадков (мм)	Средняя температура (°C)	Климатическая зона	pH	Содержание минеральных элементов в почвах исследуемых регионов				
					NO ₃ ⁻ (%)	PO ₄ ³⁻ (мд)	K ⁺ (мЭкв/ 100 г)	Ca ²⁺ (мЭкв/ 100 г)	Mg ²⁺ (мЭкв/100 г)
Спасский	189	12.5	Лесостепь	7.4	0.23	0.29	1.84	15.03	12.00
Высокогорский	261	14	Хвойно-широколиственная	6.1	0.18	0.31	1.27	15.63	1.56

условия, географическое положение, тип и состав почвы и т.д.) [8, 9].

Целью нашей работы было выявление совокупности факторов окружающей среды и перспективных регионов для выращивания и сбора лекарственных растений *B. pilosa* и *B. tripartita* с наиболее высоким содержанием биологически активных веществ. Для достижения данной цели было проведено сравнительное изучение содержания фенольных соединений двух видов растений (*B. pilosa* и *B. tripartita*), произрастающих в разных регионах Республики Бурунди и Республики Татарстан и проведена оценка степени влияния эколого-географических факторов на содержание биологически активных веществ в исследуемых растениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом исследования служила надземная часть двух видов череды: череда трехраздельная (*B. tripartita*) и череда волосистая (*B. pilosa*) из разных районов Республики Бурунди (РБ) (табл. 1): Кирими́ро (место сбора растений — суходольный луг с высокой освещенностью, высота над уровнем моря 1603 м); Мугамба (место сбора растений — суходольный луг с высокой освещенностью, высота над уровнем моря 2097 м); Бурагане (место сбора растений — суходольный луг с высокой освещенностью, высота над уровнем моря 1550 м) и Республики Татарстан (РТ) (табл. 2): Спасский (место сбора растений — остепненный луг с высокой освещенностью) и Высокогорский район (место сбо-

ра растений — придорожная западина с высокой освещенностью). Растения собирали в июле 2019 г. на стадии цветения. Состав почв с места сбора растений РБ определяли в агрохимической лаборатории анализа почвы и пищевых продуктов Института агрономических наук Бурунди (ISABU). Высоту над уровнем моря на месте сбора определяли с помощью приложения *offlinemaps*. Температурные данные и количество осадков были предоставлены Географическим институтом Бурунди (IGEBU). Состав почв с места сбора растений РТ определяли в агрохимической лаборатории Россельхознадзора РТ.

Растительный материал сушили в тени до воздушно-сухого состояния, образцы хранили в бумажных пакетах без воздействия прямых солнечных лучей. Листья растений измельчали до порошкообразного состояния. Далее полученное измельченное сырье использовали для приготовления экстрактов.

Определение суммарного содержания водорастворимых фенольных соединений. Суммарное содержание водорастворимых фенольных соединений (ВФС) определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина—Дениса в присутствии NaHCO₃. Около 50 мг измельченного растительного сырья, помещали в пробирку Эппендорф, прибавляли 1.5 мл дистиллированной воды и инкубировали на водяной бане в течение 45 мин при температуре 70°C, после чего центрифугировали при 15000 об/мин в течение 5 мин. Водный экстракт хранили при +4°C без доступа света для дальнейшего использования.

Для определения ВФС, отбирали 75 мкл водного экстракта в пробирки объемом 1.5 мл, добавляли 75 мкл реактива Фолина-Дениса, перемешивали, через 3 мин добавляли 120 мкл насыщенного раствора NaHCO_3 (10%), перемешивали, добавляли 1.2 мл воды и через 45 мин центрифугировали при 16000 об/мин в течение 2 мин. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 725 нм. В качестве контроля использовали 75 мкл воды вместо экстракта. Суммарное содержание растворимых фенольных соединений в изучаемом сырье рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{EKR V}{m \times 1000},$$

где: C — концентрация фенольных соединений, мг/г сухой массы; E — оптическая плотность при 725 нм; K — коэффициент пересчета на эталонное вещество — (–)-эпикатехин (480); R — разведение; V — объем экстракта, мл; m — масса навески растительного материала, г [10].

Определение содержания флавоноидов. Экстракт для определения флавоноидов в лекарственном сырье готовили по методике, описанной в работе [11]. Около 1 г измельченного растительного сырья, помещали в коническую колбу на 150 мл, прибавляли 30 мл 90% этилового спирта, содержащего 1% концентрированной соляной кислоты (HCl), нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и фильтровали полученный экстракт через бумажный фильтр. Экстракцию повторяли дважды. Фильтровали через тот же фильтр в ту же колбу, далее промывали фильтр 90% этиловым спиртом и доводили объем фильтра до метки (раствор А).

Для определения помещали 2 мл раствора А в колбу, добавляли 1 мл 1% раствора алюминия хлорида (AlCl_3) в 95% этиловом спирте и доводили объем раствора 95% этиловым спиртом до метки. Далее через 20 мин определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм. В качестве контроля использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенный 95% этиловым спиртом до заданного объема.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 100 \times 100}{764.6m \times 2 \times (100W)},$$

где D — оптическая плотность исследуемого раствора; 764.6 — удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом при 430 нм; m — масса сырья в граммах, г; W — потеря массы при высушивании сырья, %.

Определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин. Содержание дубильных веществ определяли путем титрования раствором перманганата калия. Для экстракции дубильных веществ 2 г сухого измельченного сырья помещали в колбу на 500 мл, заливали 250 мл кипящей воды и нагревали с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через вату, доводили водой до нужного объема. Затем отбирали 25.0 мл водного экстракта в колбу, добавляли 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0.02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания. В качестве контрольного варианта к 525 мл воды добавляли 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0.02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \times 0.004157 \times 250 \times 100}{a \times 25 \times (100W)},$$

где V — объем 0.02 М раствора калия перманганата, израсходованного на титрование водного извлечения, мл; V_1 — объем 0.02 М раствора калия перманганата, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 0.004157 — количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл 0.02 М раствору калия перманганата (в пересчете на танин), г; a — навеска сырья или лекарственного растительного препарата, г; W — влажность лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, %; 250 — общий объем водного извлечения, мл; 25 — объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Для приготовления раствора индигосульфокислоты, растворяли 1.0 г индигокармина в 25 мл концентрированной серной кислоты затем прибавляли дополнительно 25 мл серной кислоты и разбавляли водой до 1000 мл [12].

Определение содержания фенольных соединений методом ВЭЖХ. Для проведения хроматографического анализа первоначально проводили спиртовую экстракцию фенольных соединений в 70% этаноле на водяной бане в течение 90 мин [13]. Далее была проведена идентификация фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографической системе высокого давления (“BIO-RAD”, США). Использовали оригинальную колонку SN-421001911, 5 μm , 4 $\times$ 250 мм (США). Детекцию пиков осуществляли посредством двухволнового УФ ВЭЖХ детектора BioLogic QuadTec UV-Vis (“BIO-RAD”, США) при длине волны 260 нм.

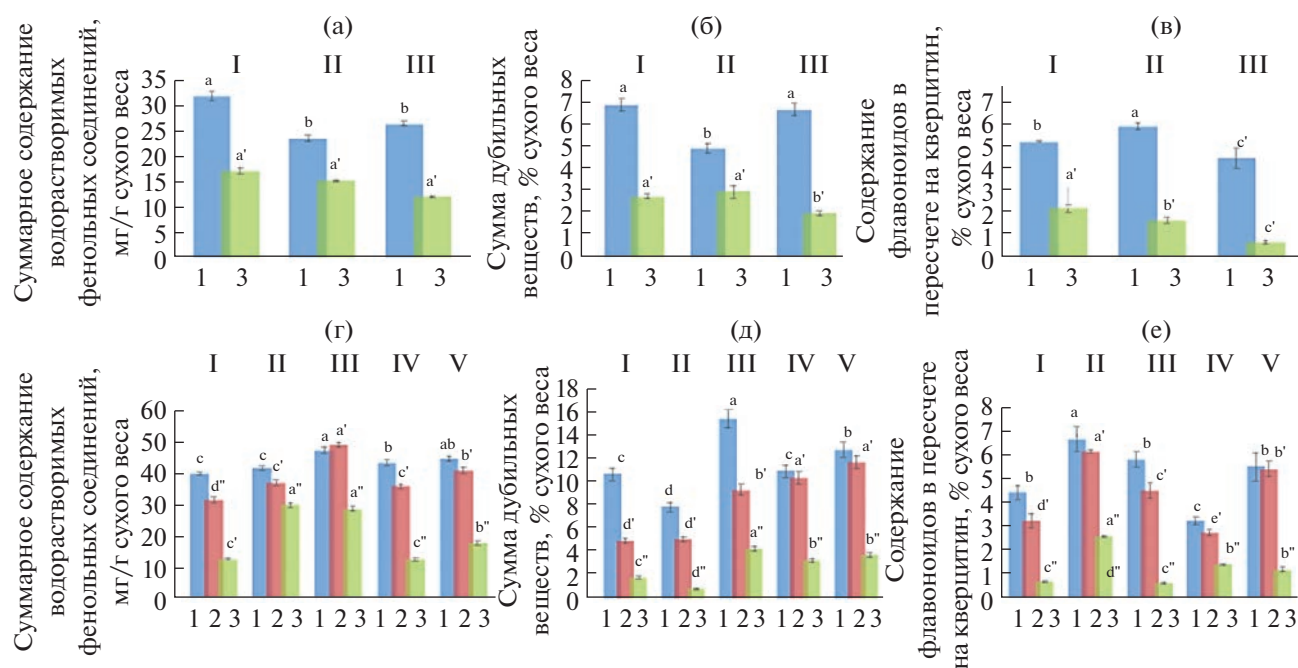


Рис. 1. Содержание фенольных соединений в *B. pilosa* (а, б, в): I – Киримири; II – Мугамба; III – Бурагане и *B. tripartita* (г, д, е): I – Высокогорский район; II – Спасский район; III – регион Киримири; IV – регион Мугамба; V – регион Бурагане. 1 – листья; 2 – цветки; 3 – стебель. Одинаковыми буквами обозначено отсутствие статистически значимых отличий между образцами, собранными в разных районах при $P < 0.05$.

В качестве подвижной фазы использовали 98% воду, 1% уксусную кислоту, 1% ацетонитрил (раствор А) и 99% ацетонитрил, 1% уксусную кислоту (Б). Элюирование: линейный градиент подвижной фазы А в фазе В составлял 30–80% от 0 до 9 мин с последующим изократическим элюированием 80% фазы А в фазе В от 9 до 15 мин; скорость потока составляла 1 мл/мин. ВЭЖХ проводили при комнатной температуре ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Для идентификации пиков выявляемых, на хроматограмме, использовали рабочие стандартные растворы кверцетина (CAS 117–39–5, $\geq 95\%$, “Sigma Aldrich”, Германия), протокатеховой кислоты (CAS 99–50–3, $\geq 98\%$, “Sigma Aldrich”, Германия), хлорогеновой кислоты (CAS 327–97–9, $\geq 95\%$, “Sigma Aldrich”, Германия), лютеолина (L9283–10MG, $\geq 98\%$, Израиль), кемпферола (CAS 520–18–3, $\geq 90\%$, “Sigma Aldrich”, Франция), кумаровой кислоты (CAS 501–98–4, $\geq 98\%$, “Sigma Aldrich”, Германия), бензойной кислоты (CAS 6585–0, $\geq 99.5\%$, “merck millipore”, Россия), феруловой кислоты (CAS 537–98–4, $\geq 98\%$, “Sigma Aldrich”, Германия), кофейной кислоты (CAS 331–39–5, $\geq 98\%$, “Sigma Aldrich”, Германия), синаповой кислоты (CAS 530–59–6, $\geq 98\%$, “Sigma Aldrich”, Германия).

Статистический анализ. Все эксперименты проводились минимум в 5-кратной повторности. Статистическая обработка данных проводилась в программе OriginPro 2021 используя дву-

сторонний критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферони для множественного сравнения при $P < 0.05$. Данные перед началом анализа связей между факторами окружающей среды и содержанием фенольных соединений подвергали тестированию на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Взаимосвязь между параметрами оценивали посредством корреляционного анализа Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание фенольных соединений в исследуемых лекарственных растениях. В ходе нашей работы был проведен сравнительный анализ содержания ВФС, дубильных веществ и флавоноидов в исследуемых лекарственных растениях, собранных из разных мест обитаний. Было обнаружено, что содержание изученных фенольных соединений в исследуемых видах лекарственных растений, произрастающих в различных регионах РТ и РБ варьирует в широких пределах в зависимости от места произрастания и различается в разных органах растений (рис. 1). Установлено, что листья имеют более высокое содержание фенольных соединений, по сравнению с цветками и стеблями. Как видно из рис. 1, в растениях *B. pilosa* содержание ВФС варьировало от 23.66 до 32.01 мг/г в листьях и от 12.19 до 17.33 мг/г сухого веса в стеблях. Растения, которые были собраны в регионе

Кирими́ро, имели наиболее высокое содержание ВФС, по сравнению с регионами Мугамба и Бурагане. Растения из Бурагане и Мугамба не отличались по содержанию данных соединений.

Содержание дубильных веществ составило от 5.04 до 7.04% сухого веса в листьях, а в стеблях — от 2.04 до 3.05% сухого веса. Как видно из рис. 1б, большее количество дубильных веществ накапливается в листьях, по сравнению со стеблями. При этом растения из Кирими́ро и Бурагане характеризовались более высоким содержанием дубильных веществ, чем растения из Мугамба.

Содержание флавоноидов в листьях *B. pilosa* было в пределах от 4.95 до 5.91% сухого веса (в пересчете на кверцетин). Самое большое количество кверцетина выявлено в растениях из Мугамба (рис. 1в). Таким образом, растения *B. pilosa* с самым высоким уровнем фенольных соединений обнаружены в регионах Кирими́ро, по сравнению с Бурагане и Мугамбе.

У растений *B. tripartita* содержание ВФС варьировало от 40.65 до 48.24 мг/г в листьях, 32.02 до 49.82 мг/г в цветках и 12.96 до 30.48 мг/г сухого веса в стеблях (рис. 1г). В целом, листья и цветки растения *B. tripartita* содержали примерно одинаковое количество ВФС. Растения, собранные в Высокогорском и Спасском районах РТ, статистически не отличались по этому показателю, как и растения из регионов Кирими́ро и Бурагане в РБ.

Самое высокое количество дубильных веществ обнаружено в листьях, самое низкое — в стеблях. В листьях растения *B. tripartita* количество дубильных веществ было в пределах от 8.04 до 15.68% сухого веса. Было выявлено что, в РТ растения из Высокогорского района, а в РБ — растения из региона Кирими́ро, содержали больше дубильных веществ, по сравнению с другими районами (рис. 1д).

Самое высокое значение флавоноидов наблюдалось в растениях, собранных из Спасского района РТ; Кирими́ро и Бурагане РБ. Больше всего их было в листьях и количество варьировалось от 3.29 до 6.77% сухого веса (в пересчете на кверцетин) (рис. 1е).

Следует отметить, что растения *B. tripartita* характеризуются более высокими количествами фенольных соединений, чем растения *B. pilosa*. При этом растения *B. tripartita*, произрастающие в условиях умеренно-континентального (Татарстан) и тропического (Бурунди) климата, имеют практически одинаковое содержание фенольных соединений.

Качественный состав фенольных соединений в исследуемых лекарственных растениях. При изучении профиля индивидуальных фенольных соединений методом ВЭЖХ в исследуемых растениях было установлено, что растения одного и того же вида не всегда синтезируют одни и те же веще-

ства и в одинаковом количестве. Каждый вид растений имеет набор индивидуальных фенольных соединений, которые играют свои специфические роли в растении при адаптации и защите от абиотических и биотических стрессоров.

Как видно из рис. 2а–2в, растения *B. pilosa* богаты разными индивидуальными фенольными соединениями с преобладанием кемпферола в регионе Кирими́ро, кверцетина в регионе Мугамба и Бурагане. Стоит отметить, что растения *B. pilosa* в регионе Кирими́ро имеют самый разнообразный фенольный состав.

У *B. tripartita* качественный анализ показал наибольшее разнообразие фенольных соединений в растениях из лесостепной зоны Спасского района РТ, а также в растениях из региона Бурагане и Кирими́ро РБ (рис. 3а–3г). Было обнаружено преобладание синаповой кислоты в растениях из Спасского района и регионов Кирими́ро и Бурагане.

Влияние эколого-географических условий на содержание биологически активных веществ в исследуемых ресурсно-полезных растениях. Для выявления решающих эколого-географических факторов, влияющих на уровень изучаемых фенольных соединений в лекарственных растениях, был проведен корреляционный анализ по Пирсону.

У растений *B. pilosa* была обнаружена высокая корреляция между содержанием фенольных соединений и гео-климатическими факторами, а также минеральными элементами почвы. Согласно данным табл. 3, содержание азота в почвах и средняя годовая температура отрицательно коррелировали с содержанием кверцетина в данных растениях, в то время как высота над уровнем моря и количество осадков положительно. Содержание ВФС и дубильных веществ в растениях *B. pilosa* положительно коррелировало с содержанием кальция и магния в почве (табл. 3).

У растений *B. tripartita* содержание кверцетина положительно коррелировало со средней температурой, содержанием в почве кальция и магния, высотой над уровнем моря и наблюдалась обратная корреляция с количеством осадков. Содержание дубильных веществ положительно коррелировало с содержанием кальция и магния в почве, а содержание ВРФ положительно коррелировало с содержанием магния в почве и отрицательно с содержанием фосфора (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Факторы окружающей среды, такие, как высота над уровнем моря, свет, температура, количество осадков, влажность и состав почвы влияют на синтез и накопление фенольных соединений в изучаемых растениях. Исследования разных авторов [14] доказывают, что количество фенольных

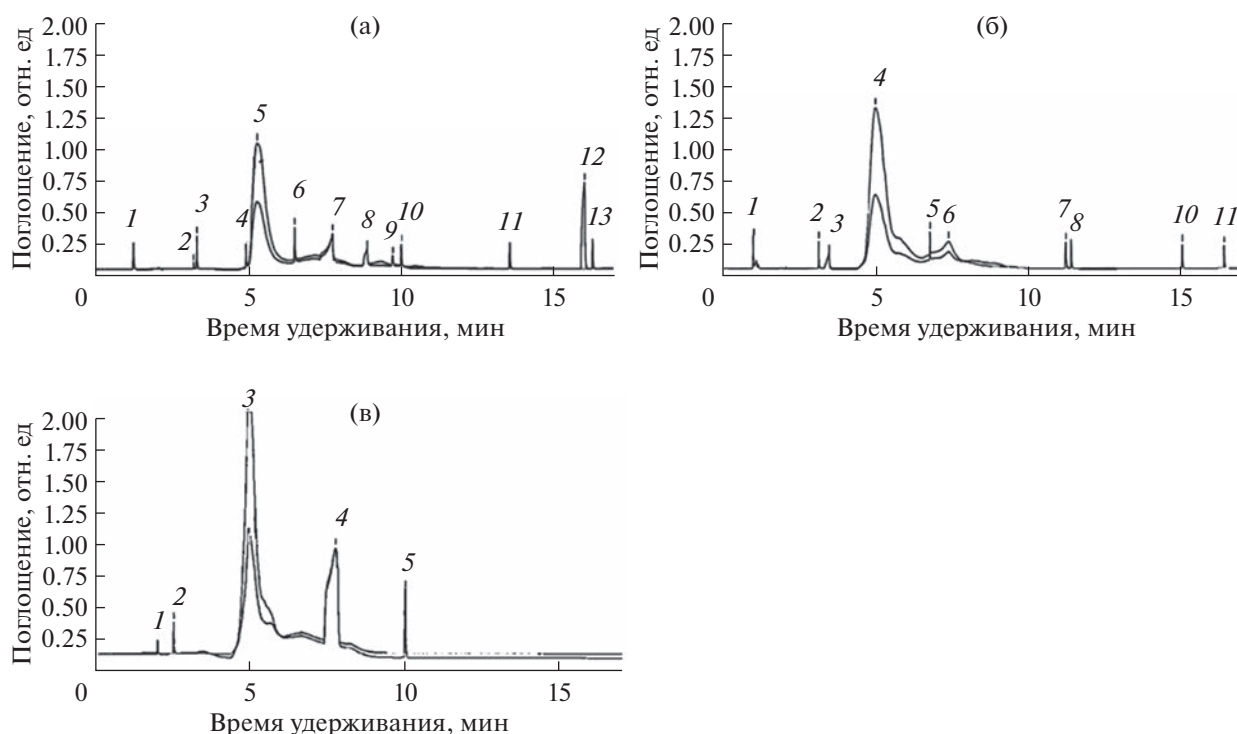


Рис. 2. ВЭЖХ хроматограммы водно-спиртового экстракта растений *B. pilosa* из разных мест произрастания: а – регион Киримири: 2 – галловая кислота, 4 – кверцетин, 5 – кемпферол, 7 – протокатехин, 10 – хлорогеновая кислота, 12 – цинарозид; б – регион Мугамба: 2 – галловая кислота, 4 – кверцетин, 5 – катехин, 8 – кофейная кислота; в – регион Бурагане: 3 – кверцетин, 4 – протокатехин, 5 – хлорогеновая кислота, 6 – лютеолин.

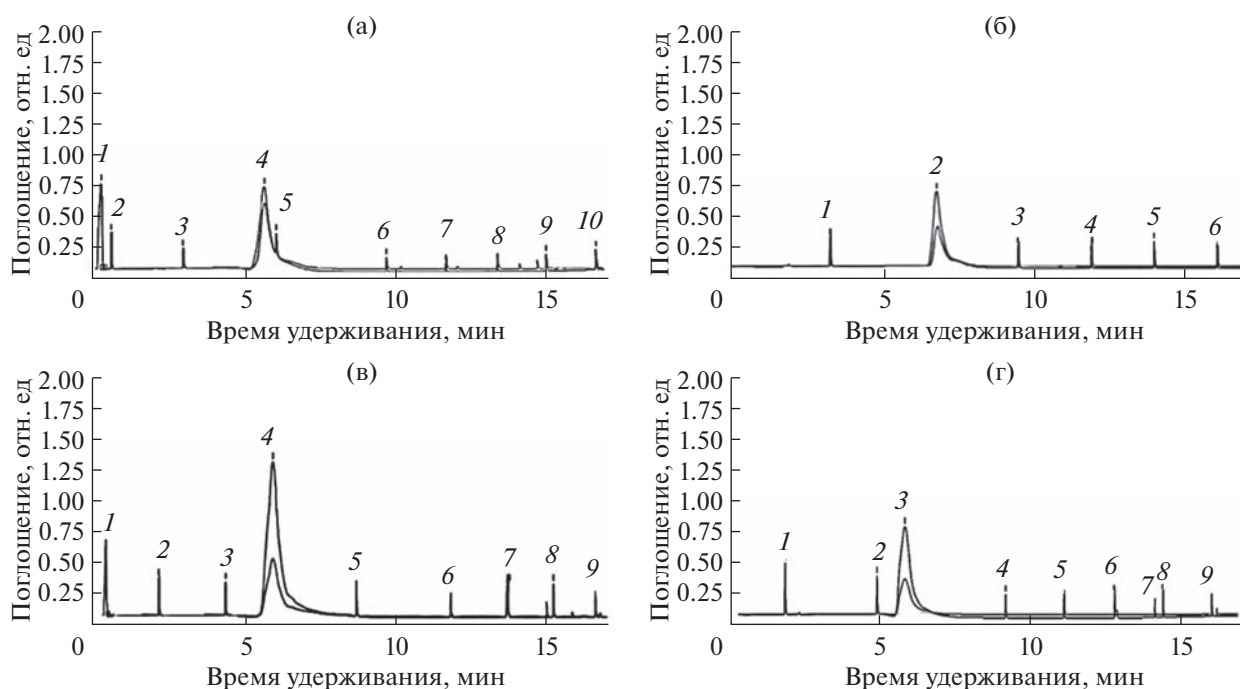


Рис. 3. ВЭЖХ хроматограммы водно-спиртового экстракта растений *B. tripartita* из разных мест произрастания: а – Спасский район: 4 – синаповая кислота, 6 – хлорогеновая кислота, 7 – кофейная кислота, 10 – лютеолин; б – Высокогорский район: 2 – катехин, 4 – кофейная кислота, 6 – цинарозид; в – регион Бурагане: 2 – коричная кислота, 4 – синаповая кислота, 5 – цис-5 кофеилхиновая, 6 – кофейная кислота; г – регион Киримири: 2 – кверцетин, 3 – синаповая кислота, 5 – кофейная кислота, 7 – кумаровая кислота.

Таблица 3. Значения коэффициента корреляции Пирсона между факторами окружающей среды и содержанием фенольных соединений в растениях *B. pilosa*

БАВ	Эколого — геологические факторы места произрастаний							
	температура	осадки	высота	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻
ВФС	0.69*	-0.70	-0.43	0.92*	0.99*	-0.08	0.07	-0.67*
Кверцетин	-0.95*	0.97*	0.99*	-0.41	-0.66	0.82	-0.97*	-0.12
Дубильные вещества	0.94*	-0.58	-0.78*	0.99*	0.98*	0.55	0.61	-0.26

Примечание: * — обозначены статистически значимая корреляция от ($P < 0.05$).

Таблица 4. Значения коэффициента корреляции Пирсона между факторами окружающей среды и содержанием фенольных соединений в растениях *B. tripartita*

БАВ	Эколого — геологические факторы места произрастаний							
	температура	осадки	высота	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻
ВФС	0.55	-0.56	-0.68	0.8*	0.73*	-0.03	0.03	-0.78*
Кверцетин	0.85*	-0.94*	0.99*	1*	0.98*	0.56	0.61	-0.27
Дубильные вещества	0.48	-0.63	-0.76*	0.87*	0.95*	0.08	0.14	-0.70

Примечание: * — обозначены статистически значимая корреляция от ($P < 0.05$).

соединений может значительно увеличиваться под воздействием различных стрессовых факторов окружающей среды. Они являются мощными антиоксидантами, поэтому эффективно обеспечивают устойчивость растений к ряду биотических и абиотических стрессоров [15]. Их повышение сказывается на стрессоустойчивости растений. Предыдущие исследования показали, что температурный стресс увеличивает синтез фенольных соединений в растениях, но в разной степени, в зависимости от вида растений. В целом холодоустойчивые растения, по-видимому, накапливают более высокие количества фенольных соединений при низкой температуре, а жароустойчивые — при более высокой. Также известно, что высота над уровнем моря играет важную роль в образовании вторичных метаболитов, которые, в конечном итоге, нейтрализуют свободные радикалы. Увеличение высоты над уровнем моря создает определенный стресс для растения, в том числе, за счет повышения УФ-излучения и понижения температуры, которые ускоряют образование свободных радикалов [16].

Состав почвы — другой фактор, который может влиять на содержание фенольных соединений. По данным литературы, при высоких концентрациях калия (K⁺), магния (Mg²⁺) и фосфора (PO₄³⁻) повышается активность фермента фенилаланинаммонийлиазы, ответственной за синтез полифенолов [17]. В других исследованиях сообщалось о влиянии длительного и постоянного азотного голодания на усиление синтеза углеродсодержащих соединений, в т.ч. и накопление фе-

нолов [18–20]. Наши результаты, подтверждают влияние вышеперечисленных факторов на накопление фенольных соединений.

Действительно, регион Киримири, который отличался высоким содержанием ВРФ и дубильных веществ в растениях *B. pilosa*, а также всех исследуемых групп фенольных соединений в растениях *B. tripartita*, характеризуется довольно кислыми почвами, низким содержанием азота и высоким содержанием кальция (Ca²⁺) и магния (Mg²⁺). А регион Мугамба, в котором обнаружили высокие значения флавоноидов в пересчете на кверцетин в растениях *B. pilosa*, находится на самой большой высоте над уровнем моря с низкими среднесуточными температурами, что подтверждает защитную функцию кверцетина в условиях стресса в качестве мощного антиоксиданта [21, 22].

В РТ в растениях *B. tripartita* Спасского района обнаружено наибольшее содержание фенольных соединений по сравнению с Высокогорским районом. Спасский район отличался от Высокогорского района более низкими температурами и слабощелочной почвой с высоким содержанием азота и калия. Хотя некоторые научные исследования показывают, что содержание полифенолов увеличивается в ответ на дефицит азота в растениях [24]. В работе [25] было показано, что содержание флавоноидов и водорастворимых фенольных соединений увеличивалось в листьях *Brassica oleracea* var. *sabellica* при внесении N : P : K. Также высокое содержание ФС в т.ч. флавоноидов, было обнаружено у растений *Eleutherine palmifolia*, обработанных N:K [26, 27]. Наблюдаемые проти-

воречия влияния минеральных веществ на содержание фенольных соединений в растениях, могут быть связаны с наличием других факторов (поскольку в природной среде на растения оказывают влияние одновременно несколько факторов), количеством и доступностью минеральных веществ и особенностями растений.

Стоит отметить, что растения *B. pilosa* и *B. tripartita*, произрастающие в условиях умеренно-континентального (Татарстан) и тропического (Бурунди) климата, слабо различаются по содержанию фенольных соединений, что свидетельствует о генетически обусловленной узкой амплитуде изменчивости метаболизма этих видов.

В ходе изучения профиля индивидуальных фенольных соединений методом ВЭЖХ наблюдали наличие кемпферола и цинарозида только в растениях *B. pilosa* из Кирими́ро, кофейной кислоты и катехина — только в растениях из Мугамбы, а лютеолина — только в растениях из Бурагане. Кверцетин присутствовал во всех образцах. Можно полагать, что существует совокупность уникальных факторов окружающей среды, которые способствуют накоплению тех или иных фенольных соединений.

Как и в случае с *B. pilosa*, растения *B. tripartita* используют разные фенольные соединения (как например, хлорогеновая кислота и лютеолин в растениях из Спасского района, катехин и цинарозид в растениях из Высокогорского района; коричная кислота и 5 цис-кофеолхиновая кислота в растениях из Бурагане и кумаровая кислота в растениях из Кирими́ро) для адаптации в разных местах обитания, что объясняет их широкое распространение. Кроме того, во всех образцах *B. tripartita* (кроме Высокогорского района) было обнаружено преобладание синаповой кислоты. Синаповая кислота является одной из наиболее распространенных гидроксикоричных кислот в растениях, проявляющей мощный антиоксидантный эффект. Антиоксидантная активность синаповой кислоты сравнима с кофейной кислотой [28].

Таким образом, установлено, что растения *B. pilosa* и *B. tripartita* из РБ и РТ, произрастающие в совершенно разных условиях, имеют близкое содержание биологически активных веществ. Вероятно, сходные механизмы адаптации изученных видов обеспечивают их выживание в совершенно разных условиях РТ и РБ.

Анализ условий произрастания растений в разных регионах РБ выявил, что наиболее благоприятно для накопления фенольных соединений у двух видов *Bidens* сочетание факторов внешней среды региона Кирими́ро. Регионы Кирими́ро и Бурагане находятся на одной высоте, количество осадков там примерно одинаковое, но при этом в регионе Кирими́ро немного ниже среднесуточные температуры, а почвы довольно кислые, с

низким содержанием азота. По крайней мере, на содержание фенольных соединений мог оказать существенно низкий уровень азота в почвах этого региона (табл. 1).

Таким образом, почвенные условия (высокое содержание магния, низкое содержание азота и довольно кислые почвы) и относительно высокие средние температуры (19°C), характерные для региона Кирими́ро, способствуют накоплению биологически активных веществ в растениях *B. pilosa* и *B. tripartita*. Для растений в РТ, по-видимому, кроме вышеперечисленных, важным фактором является зональность (лесостепная зона, Спасский район).

Работа выполнена за счет средств программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chang S.L., Chiang Y.M., Chang C.L., Yeh H.H., Shyur L.F., Kuo Y.H., Wu T.K., Yang W.C. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN-gamma expression // J Ethnopharmacol. 2007. V. 112. P. 232. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.001>
2. Wu L., Nie L., Guo S., Wang Q., Wu Z., Lin Y., Wang Y., Li B., Gao T., Yao H. Identification of medicinal *Bidens* plants for quality control based on organelle genomes // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.84213>
3. Mohi U. Environmental factors on secondary metabolism of medicinal plants // Acta Scientific Pharmaceutical Sciences. 2019. V. 3. P. 34. <https://doi.org/10.31080/ASPS.2019.03.0338>
4. Ncube B., Finnie J.F., Van Staden J. Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants // S. Afr J. Bot. 2012. V. 82. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.009>
5. Mohiuddin A.K. Impact of various environmental factors on secondary metabolism of medicinal plants // J. Pharm. ClinRes. 2019. V. 7. P. 1. <https://doi.org/10.19080/JPCR.2019.07.555704>
6. Sarker U., Oba S. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus* leafy vegetable // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1484-1>
7. Jan R., Asaf S., Numan M., Lubna Kim K.-M. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions // Agronomy. 2021. V. 11. P. 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>

8. Yuan Y., Tang X., Jia Z., Li C., Ma J., Zhang J. The Effects of ecological factors on the main medicinal components of *Dendrobium officinale* under different cultivation modes // Forests. 2020. V. 11. P. 1.
9. Issa A.M., Ambrose O.A., Mohammed M., Haruna K., Jacobus N.E. Effects of geographical location on the yield and bioactivity of *Anoigeissus leiocarpus* // J. Pharm. Biores. 2008. V. 5. P. 68. <https://doi.org/10.4314/jpb.v5i2.52995>
10. Запроматов М.Н. Фенольные соединения и методы их определения. Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. 185 С.
11. Андреева В.Ю., Калинин Г.И. "Разработка методики количественного определения флавоноидов в Манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.s.f." // Химия растительного сырья. 2000. №1. С. 85.
12. Сулейманов Ф.Ш. Определение дубильных веществ в траве Золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) // J. Sci. Articles "Health and Education Millennium". 2017. V. 19. P. 302.
13. Хуснетдинова Л.З., Акулов А.Н., Дубровная С.А. Изучение спектра биологически активных флавоноидов травы *Hypericum perforatum* L. флоры Республики Татарстан методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Химия растительного сырья. 2017. №4. С. 175.
14. Šamec D., Karalija E., Šola I., Vujčić B.V., Salopek-Sondi B. The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure // Plants. 2021. V. 10. P. 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>. PMID: 33430128; PMCID: PMC7827553
15. Nicolas N., Bruno G., Michael N.C., María M.M., Renée H.F. The influence of environmental variations on the phenolic compound profiles and antioxidant activity of two medicinal Patagonian valerians (*Valeriana carnosa* Sm. and *V. clarionifolia* Phil.) // AIMS Agriculture and Food. 2021. V. 6. P. 106. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021007>
16. Ghasemi K., Ghasemi Y., Ehteshamnia A., Nabavi S.M., Nabavi S.F., Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks // J. Medic. Plants Res. 2011. V. 5. P. 1128.
17. Ibrahim A.I., Jabbour A.A., Abdulmajeed A.M., Elhady M.E., Almaroai Y.A., Hashim A.M. Adaptive responses of four medicinal plants to high altitude oxidative stresses through the regulation of antioxidants and secondary metabolites // Agronomy. 2022. V. 12. P. 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123032>
18. Singh P., Arif Y., Bajguz A., Hayat S. The role of quercetin in plants // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 66. P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
19. Oney-Montalvo J., Uc-Varguez A., Ramírez-Rivera E., Ramírez-Sucre M., Rodríguez-Buenfil I. Influence of soil composition on the profile and content of polyphenols in habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq) // Agronomy. 2020. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091234>
20. Bénard C., Bourgaud F., Gautier H. Impact of temporary nitrogen deprivation on tomato leaf phenolics // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 7971. <https://doi.org/10.3390/ijms12117971>
21. Olsen K.M., Slimestad R., Lea U.S., Brede C., Løvdaal T., Ruoff P., Verheul M., Lillo C. Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. P. 286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01920>
22. Scheible W.R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M.K., Stitt M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2483. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047019>
23. Singh P. The role of quercetin in plants // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 166. P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
24. Jaakola L., Hohtola A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants // Plant Cell Environ. 2010. V. 33. P. 1239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02154>
25. Narvekar A.S., Tharayil N. Nitrogen fertilization influences the quantity, composition, and tissue association of foliar phenolics in strawberries // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.613839>
26. Marlin M., Simarmat M., Salamah U., Nurcholis W. Effect of nitrogen and potassium application on growth, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Eleutherine palmifolia* // AIMS Agricul. Food. 2022. V. 7. P. 580. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2022036>
27. Anteh J.D., Timofeeva O.A., Mostyakova A.A. Assessment of mineral nutrient impact on metabolites accumulation in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) // Sib. J. Life Sci. Agricul. 2021. V. 13. P. 208. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2021-13-3-208-224>
28. Nagahama N., Gastaldi B., Clifford M.N., Manifesto M.M., Fortunato R.H. The influence of environmental variations on the phenolic compound profiles and antioxidant activity of two medicinal Patagonian valerians (*Valeriana carnosa* Sm. and *V. clarionifolia* Phil.) // AIMS Agricul. Food. 2021. V. 6. P. 106. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021007>

УДК 581.1

СОДЕРЖАНИЕ ГЕНЦИОПИКРОЗИДА В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *Gentiana cruciata* L., ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

© 2023 г. Л. З. Хуснетдинова^{а, *}, А. Н. Акулов^б, С. А. Дубровная^а,
О. А. Тимофеева^а, Р. М. Мухаметшина^с

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

^бКазанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра
“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^сКазанский государственный архитектурно-строительный университет, Казань, Россия

*e-mail: husnetdinova.l@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2023 г.

После доработки 19.10.2023 г.

Принята к публикации 20.10.2023 г.

Представлены результаты количественного исследования основного иридоида генциопикрозида, фенольных соединений и флавоноидов в надземных побегах, корневищах, а также в корнях растений горечавки крестовидной (*Gentiana cruciata* L.), собранных на территории естественных фитоценозов Алексеевского, Зеленодольского и Апастовского районов Республики Татарстан. Методом спектрофотометрии проведена оценка содержания фенольных соединений и флавоноидов в растительном сырье. Показано, что максимальное количество фенольных соединений и флавоноидов в надземных частях составляет 19.4 и 10.80 мг/г для Зеленодольского и Алексеевского районов, в корневищах и корнях — 8.53 и 1.96 мг/г для Апастовского района. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии показано, что максимальное количество генциопикрозида содержится в подземной части растений и составляет более 9%, тогда как для надземной части — около 6%. Таким образом, растения горечавки крестовидной, произрастающие в фитоценозах разных районов, отличались по содержанию биологически активных веществ, что, вероятно, обусловлено влиянием комплекса эколого-ценотических условий местообитаний. Результаты фитохимического анализа позволяют предложить Апастовский район Республики Татарстан как потенциальную площадку для сбора и заготовки лекарственного растительного сырья с высоким содержанием ключевого иридоида генциопикрозида.

Ключевые слова: *Gentiana cruciata*, генциопикрозид, фенольные соединения, флавоноиды

DOI: 10.31857/S001533032360047X, **EDN:** ZFABOW

ВВЕДЕНИЕ

В традиционной и официальной медицине экстракты корней горечавок применяются при расстройствах пищеварения, сопровождаемых ахилией и диспепсическими явлениями. Эти фармакологические свойства горечавок прежде всего определяются наличием горьких веществ, возбуждающих аппетит и улучшающих усвоение пищи. Растения рода *Gentiana* (сем. *Gentianaceae*) богаты секоиридоидными гликозидами, или горечавками, такими как логановая кислота, генциопикрозид, сверциамарин, сверозид, амарогентин и др., причем лекарственное растительное сырье (ЛРС) горечавок относится к сырью, содержащему преимущественно чистые горечи [1].

Сокращения: ЛРС — лекарственное растительное сырье, РТ — Республика Татарстан.

Доминирующим секоиридоидным гликозидом в надземной части, и особенно в корневищах и корнях большинства видов горечавок, в частности, горечавки крестовидной (*Gentiana cruciata* L.) является генциопикрозид (генциопикрин) [2, 3]. Он обладает широким спектром терапевтического действия: активностью в отношении желудочно-кишечного тракта [4], антибактериальным, фунгицидным [5, 6] и анальгетическим эффектами [7]. Содержание генциопикрозида, биологически активного вещества горечавок, считают важным показателем при оценке качества лекарственного сырья [8]. Согласно исследованиям, в растениях рода *Gentiana* также идентифицированы ксантоны, флавоноиды и фенольные кислоты [1]. Суммарное содержание полифенолов в надземной части *G. cruciata* колеблется от 3.31% у образцов, собранных в горах Кавказа, до 5.94% —

произрастающих в горах Видлич (Сербия). Содержание генциопикрозида колеблется от 1.06 до 1.47% в надземной части и от 1.96 до 5.75% в корнях [9, 10].

В связи с этим представляет интерес оценка количественного содержания биологически активных соединений в различных частях многолетних растений горечавки крестовидной (*G. cruciata*), произрастающих в естественных растительных сообществах Республики Татарстан (РТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом исследования являлись растения горечавки крестовидной (*Gentiana cruciata* L.) средневозрастного генеративного онтогенетического состояния, произрастающие на территории РТ и заготовленные ручным способом (рис. 1). Сбор сырья производился в фитоценозах Алексеевского (опушечное сообщество, примыкающее к широколиственному лесу), Зеленодольского (суходольный луг на склоне, южная экспозиция) и Апастовского (остепненный луг на пологом склоне, примыкающий к широколиственному лесу) районов с соблюдением общих правил сбора [11]. Надземные органы растений были собраны в период цветения, в июле 2019 г. Подземные вегетативные органы были собраны в сентябре 2019 г. после отмирания надземных побегов.

Сырье получали методом воздушно-теневого сушки с активным вентилированием воздуха при температуре 40–60°C, согласно требованиям для сырья, содержащего монотерпеноидные горечи.

Спектрофотометрический метод. Для выделения фенольных соединений и секоиридоидных гликозидов в полипропиленовые пробирки типа Eppendorf с плотно заворачивающейся резьбовой крышкой объемом 1.5 мл помещали 25 мг предварительно растертого в ступке сухого материала. Экстракцию проводили водно-спиртовым раствором, как описано в ряде работ [12, 13], что позволяло получать как секориоидные гликозиды, так и фенольные соединения, которые также выделяют с помощью спиртовых растворов [14]. Добавляли 1 мл 80% этанола, перемешивали с использованием встряхивателя Вортекс ELMi V-3 (Elmi, Латвия) в течение 30 с и инкубировали на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 мин. Затем центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, США) и отбирали супернатант. Экстракцию повторяли дважды. Оба супернатанта объединяли и полученный экстракт использовали для анализа.

Определение содержания растворимых фенольных соединений проводили спектрофотометрически по методу Фолина–Чокальтеу в модификации Синглетона–Росси [15]. К 0.1 мл

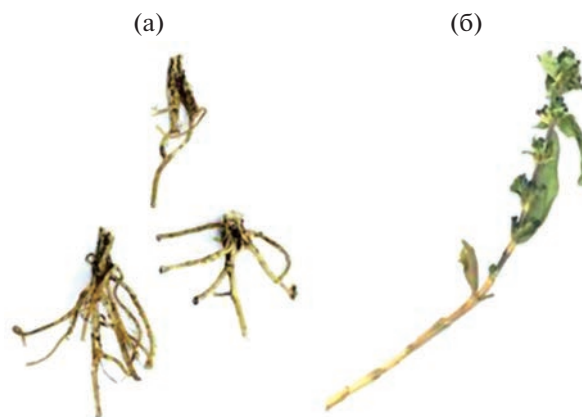


Рис. 1. Внешний вид сырья горечавки крестовидной: а — корневища и корни; б — надземная часть.

спиртового экстракта добавляли 0.5 мл реактива Фолина–Чокальтеу, через 3 мин приливали 0.4 мл водного раствора Na_2CO_3 (75 г/л). В контрольные пробирки вместо экстракта вносили 0.1 мл 80% метанола. Пробирки с реакционной смесью встряхивали и оставляли на 2 ч в темноте. Измерение оптической плотности проводили в микрокуветах при длине волны 765 нм, используя спектрофотометр Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Содержание фенольных соединений в экстракте определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по галловой кислоте (CAS 149-91-7, $\geq 98\%$ Merck). Для расчета содержания внутриклеточных фенольных соединений в образце использовали формулу: $\Phi = (CV)/m$, где Φ — общее содержание фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса; C — концентрация фенольных соединений, полученная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности образцов, мкг-экв галловой кислоты/мл; V — объем полученного экстракта, мл; m — масса навески, г.

Для определения суммарного содержания флавоноидов к 150 мкл спиртового экстракта добавляли 450 мкл 80% этанола и 30 мкл 5% раствора AlCl_3 в 2% спиртовом растворе уксусной кислоты. Перемешивали и оставляли на 30 мин. Затем измеряли оптическую плотность при 417 нм, используя спектрофотометр Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Калибровочную кривую строили по ряду концентраций (5, 10, 20, 40, 80 и 100 мкг/мл) кверцетина (CAS 117-39-5, 99%, Merck).

Хроматографический анализ. Хроматографический анализ проводили на хроматографической системе высокого давления BioLogic DuoFlow™ (BioRad, США). Использовали оригинальную колонку Symmetry® C18, 100 Å, размер пор 5 мкм, размеры колонки 3.9 × 150 мм (Waters, США). Детекцию пиков осуществляли посредством детектора BioLogic QuadTec UV/Vis (BioRad, США).

при длине волны 270 нм, соответствующей максимуму оптической плотности генциопикрозада, согласно литературным данным [9]. Для разделения использовали следующие растворы: раствор А — 0.2% ортофосфорная кислота, раствор Б — 80% ацетонитрил с 0.2% ортофосфорной кислотой. Скорость потока составляла 0.6 мл/мин. Градиент раствора Б был установлен по следующей схеме: 0–1 мин — 0%; 1–3 мин — 0–25%; 3–5 мин — 25%; 5–10 мин — 25–75%; 10–15 мин — 75%; 15–20 мин — 75–100%; 20–25 мин — 100%; 25–27 мин — 100–0%; 27–30 мин — 0%. На колонку вносили по 50 мкл спиртового экстракта. Хроматографирование проводили при комнатной температуре ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Идентификацию пика генциопикрозада проводили, используя стандартный образец раствора генциопикрозада (CAS 20831-76-9, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich). Концентрацию генциопикрозада в спиртовом экстракте определяли с помощью калибровочной кривой, которую строили по ряду концентраций: 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 и 0.125 мг/мл.

Агрохимический анализ почвы. Определение водородного показателя pH проводили по ГОСТ 26423-85. Пробу почвы массой 30 г помещали в коническую колбу. К пробам приливали 150 мл дистиллированной воды. Почву с водой перемешивали в течение 3 мин с помощью мешалки и оставляли на 5 мин для отстаивания. Часть почвенной суспензии (15–20 мл) сливали в химический стакан и использовали для измерения pH.

Общий азот определяли по ГОСТ Р 58596-2019. Навеску почвы 0.2 г помещали в пробирку и приливали 2 мл 30% перекиси водорода. Через 2 мин приливали 3 мл концентрированной серной кислоты, содержащей селен. Содержимое пробирки перемешивали и нагревали. Далее 1 мл раствора, полученного при разложении почвы, переносили в колбу и добавляли 45 мл рабочего окрашивающего реактива, состоящего из дистиллированной воды, раствора гидроокиси натрия, трилона Б и 2.5 мл рабочего раствора гипохлорита. Колбу с раствором оставляли на 1 ч для образования устойчивой окраски. Оптическую плотность окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 655 нм.

Общий азот в почве ($N_{\text{ф}}$) в процентах вычисляли по формуле:

$$N_{\text{ф}} = \frac{aV_1 \times 100}{V_2 m \times 1000} = \frac{aV_1}{V_2 m \times 10},$$

где a — количество азота в анализируемом объеме, найденное по графику, мг; V_1 — общий объем раствора после разложения почвы, мл; V_2 — объем раствора, взятый для анализа, мл; m — масса сухой почвы, г; 100 — коэффициент перевода в %; 1000 — коэффициент пересчета мг в г.

Определение подвижных соединений фосфора проводили по методу Кирсанова (ГОСТ Р 54650-2011) и Чирикова (ГОСТ 26204-91).

Метод Чирикова. Навеску почвы массой 4.0 г помещали в колбу, приливали 100 мл раствора уксусной кислоты. Почву с раствором перемешивали в течение 1 ч и оставляли на 18–20 ч. Затем суспензию фильтровали через бумажные фильтры. Далее в колбы отбирали по 5 мл раствора сравнения и вытяжек. К пробам прибавляли по 45 мл раствора аскорбиновой кислоты. Фотометрирование проводили при длине волны 710 нм.

Метод Кирсанова. Анализируемую пробу почвы массой 10 г помещали в емкость, приливали 50 мл соляной кислоты, далее перемешивали на мешалке в течение 1 мин и оставляли для отстаивания на 15 мин. Для определения соединений фосфора отбирали 2 мл градуировочного раствора, фильтратов вытяжек по 6.5 мл и прибавляли по 38 мл раствора аскорбиновой кислоты. Фотометрирование проводили при длине волны 710 нм.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли по ОФС.1.1.0013.15 “Статистическая обработка результатов химического эксперимента” [16]. Устанавливали показатели: среднее значение и стандартное отклонение. Для статистического анализа биохимических данных использовали одновыборочный критерий Стьюдента. Результаты теста являлись статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количественный анализ сырья *G. cruciata*, заготовленного в фитоценозах трех районов РТ показал, что надземные части содержат фенольные соединения и флавоноиды в высоких концентрациях. Содержание фенольных соединений в корневищах и корнях было в 2.5 раза меньше, чем в надземной части, а флавоноидов — в 9–10 раз (табл. 1).

В пределах изучаемых районов содержание фенольных соединений в подземных органах *G. cruciata* статистически значимо различалось. В надземных частях достоверные отличия по содержанию фенольных соединений были выявлены между растениями, произрастающими в Зеленодольском и Алексеевском районах, а также в Зеленодольском и Апастовском районах. Между Алексеевским и Апастовским районами достоверных отличий не наблюдалось. Содержание флавоноидов в надземных органах растений, произрастающих в Алексеевском районе статистически значимо отличалось от других мест обитания, тогда как между Зеленодольским и Апастовским районами достоверных отличий не было выявлено. Достоверные различия по содержанию флавоноидов в корневищах и корнях у *G. cruciata*,

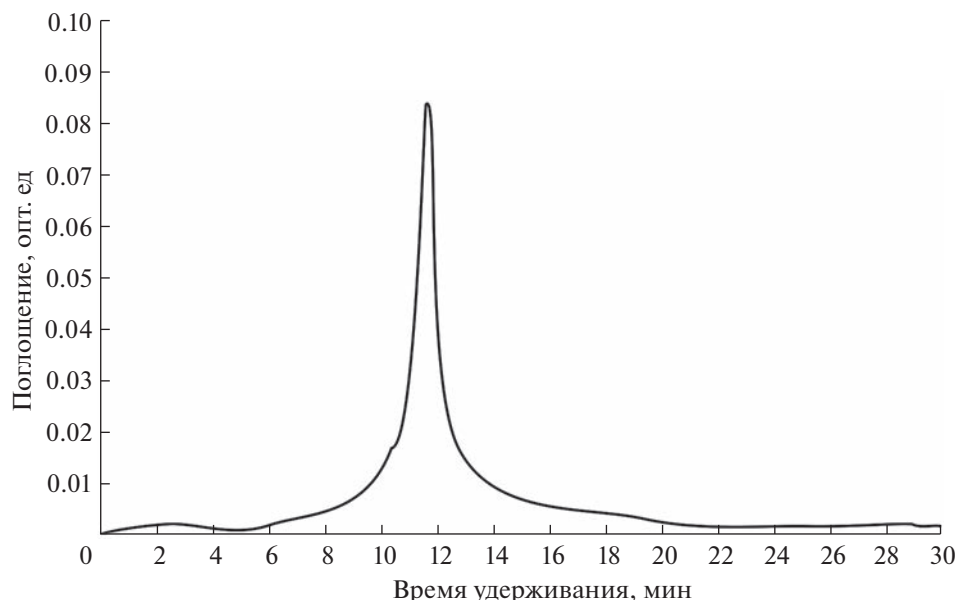


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма стандартного образца генциопикроза.

произрастающих в Зеленодольском и Алексеевском районах отсутствовали, в то время, как между Зеленодольским и Апастовским, а также Алексеевским и Апастовским районами различия были статистически значимы при $P < 0.05$. В Зеленодольском районе в ЛРС *G. cruciata* содержалось в 1.6 раз меньше фенольных и флавоноидных соединений, чем у растений, произрастающих в Апастовском районе.

Доминирующими компонентами в *G. cruciata* являлись секоиридоидные горечи. Содержание генциопикроза в растительных образцах определяли методом ВЭЖХ. Идентификацию пика генциопикроза на хроматограммах экстрактов образцов (рис. 3) проводили сопоставлением времени удерживания (R_t) компонентов экстракта (табл. 2) по отношению к времени удерживания

стандартного образца генциопикроза (рис. 2), которое составило 12.22 мин.

По результатам ВЭЖХ-анализа было установлено, что во всех районах, где производился сбор ЛРС, содержание генциопикроза в корневищах и корнях в 1.4–2.0 раза превышало его содержание в надземной части. Содержание генциопикроза в корневищах и корнях у растений, собранных в Апастовском районе составило 9.05% и было достоверно выше, по сравнению с его содержанием в образцах растений из Алексеевского и Зеленодольского районов (табл. 2), что, вероятно, обусловлено эколого-ценотическими условиями местообитания.

Кроме доминирующего пика генциопикроза на хроматограммах экстрактов корневищ и корней (рис. 3) присутствовало еще три пика (пик

Таблица 1. Содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов в растениях *Gentiana cruciata*, произрастающих на территории Республики Татарстан

Сырье	Район сбора	Содержание, мг/г сухого веса	
		фенольные соединения	флавоноиды
Надземные части	Алексеевский	18.3 ± 0.22^a	10.80 ± 0.15^c
	Зеленодольский	19.4 ± 0.28^c	9.73 ± 0.16^a
	Апастовский	18.4 ± 0.32^a	9.05 ± 0.18^a
Корневища и корни	Алексеевский	7.18 ± 0.67^d	1.32 ± 0.08^b
	Зеленодольский	5.31 ± 0.43^e	1.06 ± 0.06^b
	Апастовский	8.53 ± 0.33^f	1.96 ± 0.1^d

Примечание. Разные надстрочные символы обозначают статистически значимые изменения величины исследуемого показателя при $P \leq 0.05$.

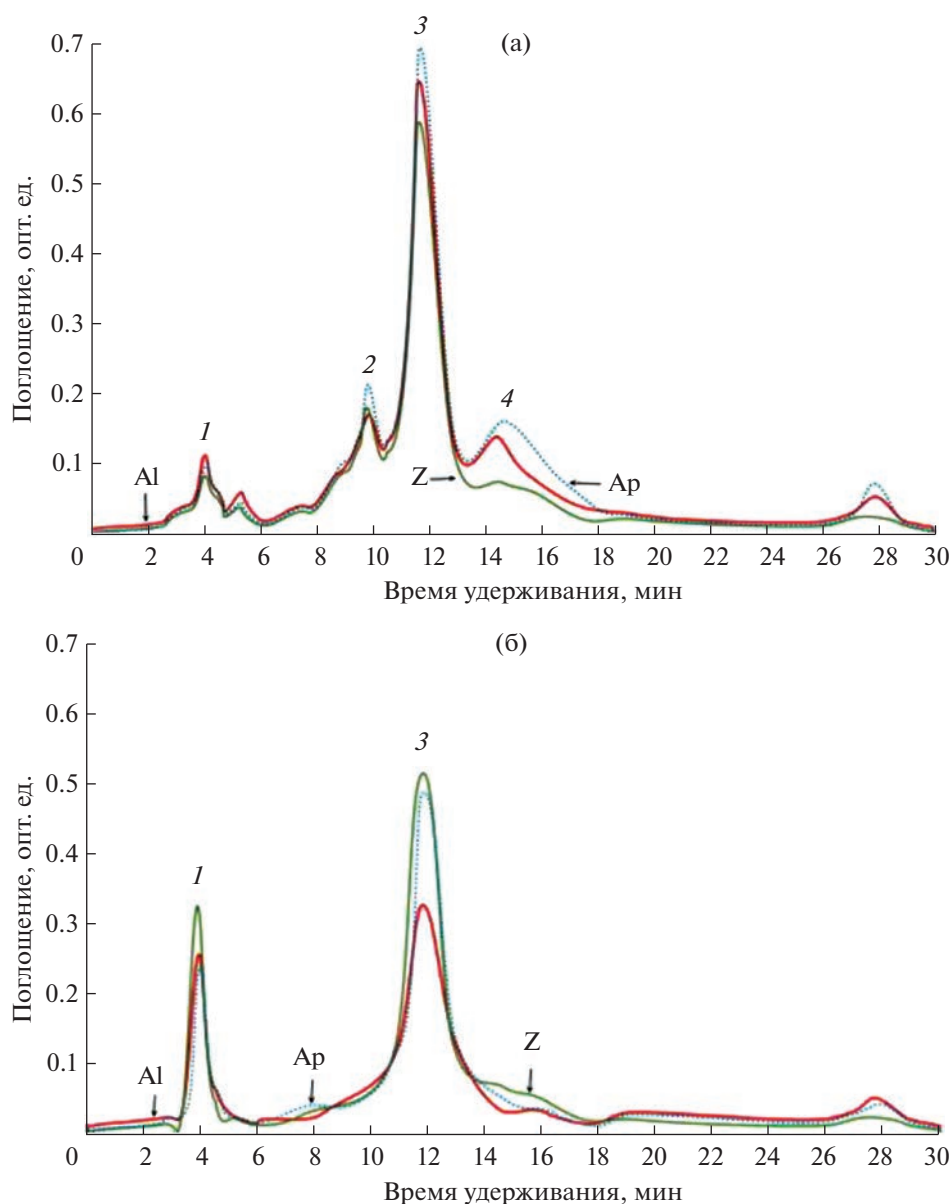


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма водно-спиртового экстракта корневищ и корней (а) и надземных частей (б) горечавки крестовидной, собранных в Алексеевском (АлР), Зеленодольском (ЗР) и Апастовском (АпР) районах Республики Татарстан. 1 – логановая кислота, 2 – сверциамарин, 3 – генциопикрозид, 4 – сверозид.

Таблица 2. Время удержания и содержание генциопикрозида в образцах растений *Gentiana cruciata*, произрастающих на территории Республики Татарстан

Сырье	Район сбора	R_t , мин	Содержание генциопикрозида, %
Надземные части	Алексеевский	12.21	4.83 ± 0.12^b
	Зеленодольский	12.22	6.49 ± 0.15^a
	Апастовский	12.20	6.43 ± 0.21^a
Корневища и корни	Алексеевский	12.21	8.39 ± 0.18^c
	Зеленодольский	12.20	7.42 ± 0.22^d
	Апастовский	12.22	9.05 ± 0.28^e

Примечание. Разные надстрочные символы обозначают статистически значимые изменения величины исследуемого показателя при $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Агрохимические показатели почв районов республики Татарстан

Показатели	Алексеевский район	Зеленодольский район	Апастовский район
pH	5.5 ± 0.15	5.8 ± 0.06	6.0 ± 0.15
Подвижный фосфор, мг/кг	80 ± 5.0	80.6 ± 6.1	177 ± 4.0
Общий азот, мг/кг	35.85 ± 2.7	31.10 ± 3.6	11.9 ± 3.08

№ 1, 2, 4), которые предположительно могут являться логановая кислотой, сверциамарином и сверозидом соответственно.

На хроматограммах экстрактов надземной части присутствие пиков 2 и 4 не выявлено, однако интенсивность пика № 1 была в 2.0–2.5 раза выше, по сравнению с экстрактами, полученными из корневищ и корней.

При сопоставлении полученных данных о содержании фенольных соединений и генциопикроза в корневищах и корнях со степенью плодородия почв (табл. 3) отмечено, что высокое содержание подвижного фосфора и низкое содержание общего азота положительно влияет на накопление этих веществ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для нашей страны, особенно в рамках политики импортозамещения, актуальным является вопрос поиска альтернативного источника ЛРС горечавки желтой, природные запасы которой на территории России отсутствуют, а культура достаточно трудоемка. Фармакопеями многих стран допускается использование других видов обширного рода *Gentiana*, ареал произрастания которых охватывает, в том числе и территорию РТ [17]. Результаты фитохимических исследований показали, что в надземных и подземных органах *G. cruciata*, произрастающей на территории РТ, содержатся соединения терпеноидной природы, фенольные соединения, а также алкалоиды [1]. Согласно литературным источникам, надземная часть *G. cruciata* содержит также секоиридоиды и фенольные соединения в высоких концентрациях [18]. В подземных органах содержание фенольных соединений меньше, но отмечается более высокая концентрация секоиридоидов (2.22%), чем в надземной части (2.04%) [9]. В нашей работе также показано, что у *G. cruciata*, произрастающей в разных районах РТ, содержание фенольных соединений, в том числе флавоноидов, значительно выше в надземных органах (18.3–19.4 мг/г сухого веса) по сравнению с корневищами и корнями (5.31–8.53 мг/г сухого веса), что, по-видимому, обусловлено повышенной активностью биосинтеза и накопления полифенолов в надземной части. Известно, что повышение накопления полифенолов может быть индуцировано либо стрессовыми воздействиями, когда фе-

нольные соединения выполняют защитную роль, либо, наоборот, достижением оптимальных природных факторов и условий для их биосинтеза. Значимым фактором, оказывающим влияние на уровень содержания биологически активных веществ, является освещенность. Растения горечавки крестовидной в Зеленодольском районе произрастали на суходольном лугу на склоне, южной экспозиции с высоким уровнем солнечной радиации в окружении сеgetально-рудеральных видов. При рассмотрении влияния освещенности на содержание фенольных соединений в надземной части можно обнаружить закономерность: в растениях более освещенных местообитаний (луговой ценоз) содержание суммы фенольных соединений выше, чем в растениях, произрастающих в затененных условиях под пологом леса, что подтверждает более ранние данные [19].

ВЭЖХ-анализ выявил, что максимальное количество генциопикроза характерно для корневищ и корней *G. cruciata*, собранных в фитоценозе остепненного луга Апастовского района РТ, и составляет более 9%. Наблюдаемое повышенное количество генциопикроза в экстрактах подземных органов растений по сравнению с надземной частью, вероятно, указывает на различия в качественном составе накапливаемых соединений, что отмечалось и другими авторами [9]. По данным литературы в ЛРС горечавок наиболее высокое содержание генциопикроза, тогда как амарогентина, сверциамарина и сверозидов значительно меньше [20]. Доминирующим секоиридоидным гликозидом как в надземной, так и в подземной части является генциопикрозид, что выявлено в ходе многочисленных исследований [9, 21, 22]. Наибольшее содержание генциопикроза отмечено в корнях [3], где локализуются также его гликозильированные формы: генциопикрозид-6'-О-глюкозид и генциопикрозид-ди-О-гексозид [10].

В ряде работ было показано, что в горечавке крестовидной содержатся логановая кислота [1, 3] и ее производные, такие как логанин (сложный метиловый эфир логановой кислоты) и разные гликозиды логановой кислоты [10]. Известно, что сверциамарин является предшественником генциопикроза по пути биосинтеза, который проходит в надземной части, с дальнейшим перемещением горечей в корни [10, 23, 24].

Из литературных данных известно, что ряд факторов окружающей среды (географическое положение, климат и почва) оказывают комплексное влияние на содержание гентиопикризида в корневой части растений рода *Gentiana* [22]. Выявленное нами наибольшее содержание гентиопикризида в корневищах и корнях горечавки крестовидной в Апастовском районе, по сравнению с остальными местами сбора, вероятно определяется двумя факторами — почвенным фактором — соотношением содержания общего азота и подвижного фосфора, которое характерно для почвы этого района, и освещенностью, так как образцы собранных растений произрастали на склоне остепененного луга, примыкающего к широколиственному лесу.

Таким образом, высокое содержание основного биологически активного вещества — гентиопикризида, позволяет рассматривать Апастовский район РТ в качестве перспективной территории для сбора и заготовки лекарственного растительного сырья *G. cruciata*.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при частичной финансовой поддержке Государственного задания Казанского института биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” (№ госрегистрации 122011800137).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xu Y., Li Y., Maffucci K.G., Huang L., Zeng R. Analytical methods of phytochemicals from the genus *Gentiana* // *Molecules*. 2017. V. 22. P. 2080. <https://doi.org/10.3390/molecules22122080>
2. Szűcs Z., Dános B., Nyiredy S. Comparative analysis of the underground parts of *Gentiana* species by HPLC with diode-array and mass spectrometric detection // *Chromatographia*. 2002. V. 56. P. 19. <https://doi.org/10.1007/BF02494108>
3. Hayta S., Gurel A., Akgun I.H., Altan F., Ganzera M., Tanyolac B., Bedir E. Induction of *Gentiana cruciata* hairy roots and their secondary metabolites // *Biologia*. 2011. V. 66. P. 618. <https://doi.org/10.2478/s11756-011-0076-4>
4. Mirzaee F., Hosseini A., Jouybari H.B., Davoodi A., Azadbakht M. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species // *J. Tradit. Complement. Med.* 2017. 7(4). P. 400. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.013>
5. Nadinic E., Penna C., Saavedra C., Coussio J., Gutkind G., Debenedetti S. Isolation of antimicrobial compounds from *Gentianella achalensis* (Gilg.) Ho & Liu (*Gentiana* ceae) extracts // *Lat. Am. J. Pharm.* 2002. V. 21. P. 123. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0210-z>
6. Kumarasamy Y., Nahar L., Cox P.J., Jaspars M., Sarker S.D. Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea* // *Phytomedicine*. 2003. V. 10. P. 344. <https://doi.org/10.1078/094471103322004857>
7. Chen L., Liu J.C., Zhang X.N., Guo Y.Y., Xu Z.H., Cao W., Sun X.L., Sun W.J., Zhao M.G. Down-regulation of NR2B receptors partially contributes to analgesic effects of Gentiopicroside in persistent inflammatory pain // *Neuropharmacology*. 2008. 54(8). P. 1175. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.03.007>
8. Чжан Ц., Гончаров А.А., Ван Ц., Сунь Я. Исследование регенерации подземных органов горечавки шероховатой (*Gentiana scabra* Bunge) // *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2018. № 2. С. 224.
9. Mihailović V., Mišić D., Matić S., Mihailović M., Stanić S., Vrić M.M., Katanić J., Mladenović M., Stanković N., Boroja T., Stanković M.S. Comparative phytochemical analysis of *Gentiana cruciata* L. roots and aerial parts, and their biological activities // *Ind. Crops Prod.* 2015. V. 73. P. 49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.013>
10. Olennikov D.N., Gadimli A.I., Isaev J.I., Kashchenko N.I., Prokopyev A.S., Kataeva T.N., Chirikova N.K., Vennos C. Caucasian *Gentiana* species: untargeted LC-MS metabolic profiling, antioxidant and digestive enzyme inhibiting activity of six plants // *Metabolites*. 2019. V. 9. P. 271. <https://doi.org/10.3390/metabo9110271>
11. Самылина И.А. Фармакогнозия. Москва: Медицинское информационное агентство, 2011. 432 с.
12. Venditti A., Frezza C., Maggi F., Lupidi G., Bramucci M., Quassinti L., Giuliani C., Cianfaglione K., Papa F., Serafini M., Bianco A. Phytochemistry, micromorphology and bioactivities of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (Lamiaceae, Ajugoideae): two new harpagide derivatives and an unusual iridoid glycosides pattern // *Fitoterapia*. 2016. V. 113. P. 35. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.06.016>
13. Toiu A., Mocan A., Vlase L., Pârvu A.E., Vodnar D.C., Gheldiu A.M., Moldovan C., Oniga I. Comparative phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and in vivo anti-inflammatory activity of different extracts of traditionally used romanian *Ajuga genevensis* L. and *A. reptans* L. (Lamiaceae) // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1597. <https://doi.org/10.3390/molecules24081597>
14. Sun C., Wu Z., Wang Z., Zhang H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of beijing propolis extracts // *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015. Article ID: 595393. <https://doi.org/10.1155/2015/595393>
15. Agati G., Tattini M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection // *New Phytol.* 2010. V. 186. P. 786. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. Москва: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2005. С. 235
17. Куцук Р.В., Зузук Б.М. Горечавка желтая (*Gentiana lutea* L.) (аналитический обзор) // *Провизор*. 2003. № 5. С. 21

18. Боровик Т.С., Прибыткова Л.Н. Сравнительное исследование видов рода *Gentiana*, интродуцируемых в Западной Сибири // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 12. С. 33
19. Weissenböck G., Reznik H. Änderungen des flavonoid – musters während der samenkeimung von *Impatiens balsamina* L. // Zeitschrift Pflanzenphysiologie. 1970. № 63. P. 114.
20. Aberham A., Pieri A., Croom Jr.E.M., Ellmerer E., Stuppner H. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthones in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC // J. Pharm. Biomed. Anal. 2011. V. 54. P. 517.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.030>
21. Szűcs Z., Dános B., Nyiredy S. Comparative analysis of the underground parts of *Gentiana* species by HPLC with diode-array and mass spectrometric detection // Chromatographia. 2002. V. 56. P. 19.
<https://doi.org/10.1007/BF02494108>
22. Zhang J., Zhang Z., Wang Y., Zuo Y., Cai C. Environmental impact on the variability in quality of *Gentiana rigescens*, a medicinal plant in southwest China // Glob. Ecol. Conserv. 2020. V. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01374>
23. Tovilovic-Kovacevic G., Zogovic N., Krstic-Milosevic D. Secondary metabolites from endangered *Gentiana*, *Gentianella*, *Centaurium*, and *Swertia* species (Gentianaceae): promising natural biotherapeutics // Biodivers. Biomed. 2020. V. 19. P. 335.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00019-0>
24. Yang Y., Zhao Y., Zuo Z., Zhang J., Shi Y., Wang Y. Investigation of a medical plant for hepatic diseases with secoiridoids using HPLC and FT-IR spectroscopy for a case of *Gentiana rigescens* // Molecules. 2020. V. 25. P. 1219.
<https://doi.org/10.3390/molecules25051219>

УДК 581.1:66.061.34

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕКСА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЯГОДАХ КАМЧАТСКОЙ ЖИМОЛОСТИ

Lonicera caerulea var. *kamtschatica* Sevast¹

© 2023 г. М. П. Разгонова^{а, *}, Е. Н. Петруша^б, Е. А. Русакова^б, К. С. Голохваст^с

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова”, Санкт-Петербург, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Камчатский научно-исследовательский институт сельского хозяйства”,
Камчатский край, п. Сосновка, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное учреждение науки
“Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук”,
Новосибирская область, п. Краснообск, Россия

*e-mail: m.razgonova@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 22.09.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принята к публикации 04.11.2023 г.

Впервые проведен комплексный анализ полифенольных соединений в экстрактах ягод жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast.). В работе использовали 5 образцов дикой жимолости и один сортобразец Елена из коллекции Камчатского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Для идентификации целевых аналитов в экстрактах применяли tandemную масс-спектрометрию высокого разрешения. Идентифицировано 58 полифенольных соединений, соответствующих семейству *Caprifoliaceae*. К идентифицированным аналитам некоторые соединения были определены впервые: флавоны — гидроксигенистеин, диосметин О-гексозид, хризоеприол-О-ди-глюкозид; флаванолы — гербацетин, мирицетин, астрагаллин, таксифолин-О-гексозид, рамноцитрин; флаван-3-олы — эпиафзелехин, эпикатехин-О-гексозид, димер эпигаллокатехин-эпикатехина; фенольные кислоты — гидроксиферуловая кислота, гидроксиметокси диметилбензойная кислота, неохлорогеновая кислота, эллаговая кислота; стильбены — пиносильвин, ресвератрол и многие другие полифенолы. Наиболее богатым по содержанию полифенольных соединений был сортобразец дикой формы № 5 — 23 полифенольных соединения, далее следует сортобразец Елена — 21 полифенольное соединение.

Ключевые слова: *Lonicera caerulea*, *Caprifoliaceae*, жимолость камчатская, ВЭЖХ–МС/МС, фенольные соединения

DOI: 10.31857/S0015330323600791, **EDN:** BFZLWQ

ВВЕДЕНИЕ

Жимолость камчатская (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast.) — подвид голубых жимолостей, широко распространенный на Камчатке. В центральной и южной частях полуострова она произрастает большими массивами по несколько десятков гектаров. Основным местообитанием данного подвида являются лиственничные и березовые леса, разнотравные луга, заросли кустарников, каменистые осыпи, шикшешники, болота, кустарничковые тундры. Наилучшие условия для произрастания жимолости создаются в производных типах леса, измененных в результате деятель-

ности человека — на вырубках, а также старых лесных гарях. В субальпийском поясе жимолость поднимается до высоты 980 м над уровнем моря [1, 2].

Плоды жимолости камчатской широко используются местным населением в свежем и переработанном виде. Несмотря на повсеместное произрастание жимолости на Камчатке в природе, данная культура с каждым годом получает все большее распространение в камчатском садоводстве. К наиболее ценным характеристикам жимолости относятся ее раннеспелость, что особенно важно для питания населения северных регионов в период витаминного дефицита после длительной зимы, а также высокие питательные и лечебно-профилактические свойства [3, 4].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600791 для авторизованных пользователей.

Согласно результатам последних исследований, класс витаминов в плодах жимолости включает в себя аскорбиновую кислоту (в среднем до 44.4 мг %), каротин (провитамин А), тиамин, рибофлавин, фолиевую кислоту и Р-активные полифенолы (витамин Р). Присутствующие в плодах витамины С и Р усиливают действие друг друга, так как обладают синергизмом. К биологически активным полифенолам, содержащимся в плодах жимолости, относятся свободные катехины, антоцианы, рутин, хлорогеновая кислота. Доля растворимых сухих веществ в плодах составляет 12.8%. Высокая дегустационная оценка плодов жимолости и наличие сбалансированного гармоничного вкуса обусловлены высоким содержанием сахаров (8.5%) при сравнительно низкой кислотности (1.9–25%), а приятный аромат – наличием сложных эфиров лимонной и яблочной кислот. В свежих плодах жимолости определяются также диетические продукты – сорбит и инозит. В числе аминокислот присутствуют аспарагиновая, глутаминовая, аланиновая и лейцитиновая кислоты. В плодах жимолости содержатся такие макроэлементы, как калий, фосфор, кальций, натрий, магний, железо, кремний, и микроэлементы – медь, цинк, стронций, барий и йод [5, 6].

Пищевая ценность и лекарственные свойства жимолости камчатской позволяют широко использовать ее как функциональный природный растительный ресурс. Современные способы промышленной переработки дают возможность получать из ягод жимолости различные продукты, отличающиеся оригинальным вкусом и ароматом, а также насыщенным ярким цветом [7].

В качестве донора десертного кисло-сладкого вкуса, приятного аромата, крупноплодности, высокой зимостойкости и хорошей транспортабельности ягод жимолость камчатская широко используется в селекционных программах в различных регионах страны. [8]. Сорта, созданные на основе отборных форм жимолости камчатской, впервые были зарегистрированы в 1980 г. На Камчатке первый селекционный питомник на основе генетического материала дикорастущей жимолости был заложен в 1987 г. на базе Камчатского научно-исследовательского института сельского хозяйства, расположенного в п. Сосновка (Елизовский район). Почвенно-климатические условия данного района являются наиболее благоприятными для возделывания ягодных культур и в том числе жимолости.

В результате многолетней работы изучено около 4000 сеянцев из различных мест произрастания на территории края. В элиту выделены перспективные селекционно-значимые формы раннего и среднераннего сроков созревания, с высокой зимостойкостью, обладающие привлекательными неосыпающимися плодами десерт-

ного и кисло-сладкого вкуса с массой от 1.0 до 1.2 г, с содержанием аскорбиновой кислоты от 50.8 до 56.9 мг %, сухого вещества от 15.2 до 15.6%, сахаров от 7.8 до 10.5%, кислоты от 1.8 до 2.5%. Методом аналитической селекции созданы сорта Соперница-Горянка – сеянец жимолости алтайской от свободного опыления, Сластина, Атлант, Мильковчанка, Даринка, Елена – сеянцы жимолости камчатской от свободного опыления.

Исходным материалом для селекции послужили ягоды жимолости, отобранные в местах естественного произрастания культуры, расположенных в Юго-Восточной и Центральной зонах Камчатки: окрестности г. Петропавловск-Камчатский, г. Елизово, п. Сосновка, с. Раздольное, с. Мильково и др. Административно данные пункты относятся к Елизовскому, Мильковскому, Быстринскому и Усть-Камчатскому районам края. На сегодняшний день селекционный материал планомерно обновляется, закладываются новые питомники, в изучении находится более 500 сеянцев дикорастущих форм посадки 2018–2022 гг. В июле–августе 2023 г. с целью сбора генетического материала была предпринята обширная экспедиция, в результате которой обследованы новые локалитеты во всех основных районах произрастания подвидов и отобрана 51 форма жимолости камчатской для закладки новых селекционных питомников.

Целью данной работы является анализ содержания фенольных соединений в ягодах жимолости камчатской пяти дикорастущих образцов и сорта Елена, зарегистрированного в коллекции Камчатского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Начальный метаболомный анализ показал наличие 58 соединений полифенольной группы, обнаруженных в экстрактах представленных видов жимолости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследований использовались шесть сортообразцов жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtshatica* Sevest.). Экстракты сортообразцов ягод, использованных в эксперименте: № 1–5 – дикие формы жимолости (табл. 1); сорт Елена, зарегистрирован в коллекции Камчатского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Все образцы собраны в июле 2023 г. и хранились в морозильной камере при температуре –15°C не более недели до начала экспериментов. Все образцы соответствовали морфологическим стандартам Фармакопеи Евразийского экономического союза [9].

Дробная мацерация. Для получения высококонцентрированных экстрактов была применена дробная мацерация. Для мацерационного анали-

Таблица 1. Места сбора диких форм жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*)

№ образца	Местонахождение	Географические координаты
1	Полуостров Камчатка, район Быстринский, подножие горы Оленгендэ	541 м над ур. м.; 55°9'15.848" N 158°71'68.477" E
2	Полуостров Камчатка, район Елизовский, окрестности п. Вулканный	11 м над ур. м.; 53°6'49.618" N 158°23'10.430" E
3	Там же	21 м над ур. м.; 53°6'50.848" N 158°23'2.915" E
4	Там же	19 м над ур. м.; 53°6'50.910" N 158°23'2.722" E
5	Там же	16 м над ур. м.; 53°6'49.974" N 158°23'10.331" E

за было отобрано по 50 г ягод каждого сортообразца (сорт Елена и пять форм дикорастущей жимолости), при этом общее количество экстрагента (этилового спирта) разделено на 3 части и последовательно настояно на ягодах. Время настаивания каждой части экстрагента составляло 7 дней.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Для разделения многокомпонентных смесей использовался жидкостный хроматограф высокого давления Shimadzu LC-20 Prominence HPLC (Shimadzu, Япония), оборудованный UV-детектором и обратной фазной колонкой Shodex ODP-40 4E (250 × 4.6, размер частиц 4 мкм). Элюировали в градиенте от воды к ацетонитрилу (А, %): 0–4 мин – 0% А; 4–60 мин – 25% А; 60–75 мин – 100% А; 75–120 мин – 100% А, скорость потока 0.5 мл/мин. ВЭЖХ-анализ проведен при помощи UV-VIS-детектора SPD-20A (Kanda-Nishikicho 1-chrome, Shimadzu, Chiyoda-ku, Tokyo, Япония) при длинах волн 230 и 330 нм, температура 50°C. Объем загрузочной петли составлял 200 мкл.

Тандемная масс-спектрометрия. Жидкостный хроматограф высокого давления при прохождении экспериментов был сопряжен с ионной ловушкой amaZon SL в онлайн-режиме. Масс-спектрометрические данные получены с помощью ионной ловушки amaZon SL (Bruker Daltoniks, Германия), оснащенной источником ионизации электрораспылением ESI в режимах отрицательных и положительных ионов. Оптимизированные параметры получены следующим образом: температура источника ионизации – 70°C, поток газа – 8 л/мин, газ-небулайзер (распылитель) – 7.3 psi, капиллярное напряжение – 4500 В, напряжение на изгибе торцевой пластины – 1500 В,

фрагментатор – 280 В, энергия столкновения – 60 eV. Масс-спектрометр использовался в диапазоне сканирования m/z 100 – 1.700 для МС и МС/МС. Произведена фрагментация 4 порядка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уточнение метаболомного состава растительных матриц – чрезвычайно важный результат в системе биохимического анализа. В данной работе был использован метод ВЭЖХ-МС/МС (ВЭЖХ, сопряженный онлайн с МС источником электрораспыления) и анализом фрагментированных ионов. Масс-спектрометрические данные регистрировались на ионной ловушке AMAZON SL Bruker Daltoniks, оснащенной источником ESI в режиме отрицательных/положительных ионов. Использовалось 4-ступенчатое фрагментирование ионов.

Идентификация химических компонентов проводилась путем сравнения их индекса удерживания, масс-спектров и фрагментации МС с базой данных домашней библиотеки, созданной Группой биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем “Передовые инженерные школы” Дальневосточного федерального университета (Россия) на основе данных других спектроскопических методов, таких как ядерный магнитный резонанс, ультрафиолетовая спектроскопия и МС, а также сравнения полученных экспериментальных данных с известными научными результатами, опубликованными в открытой научной литературе, которые постоянно обновляются и пересматриваются. Для простоты идентификации составлена унифицированная системная таблица молекулярных масс целевых аналитов, вы-

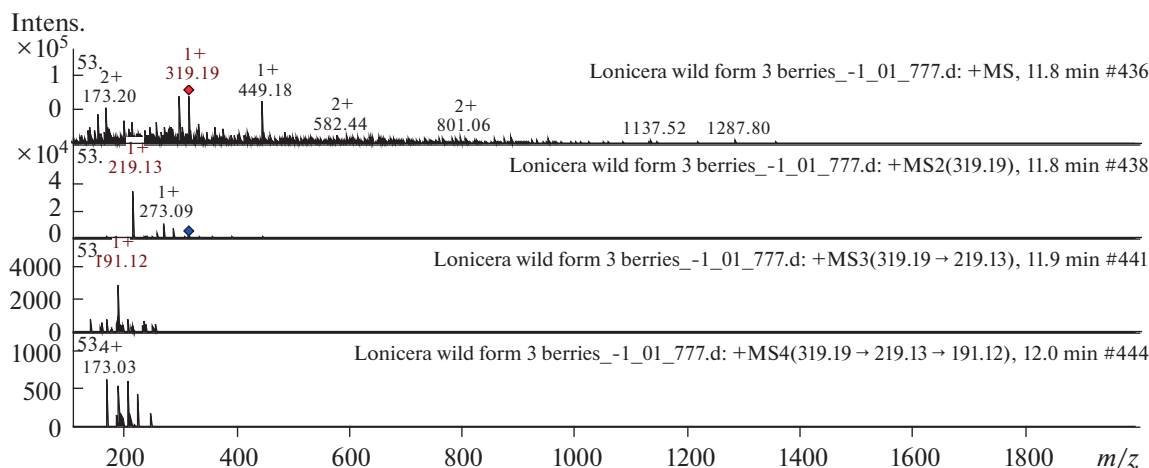


Рис. 1. Масс-спектры мирицетина из экстракта ягод жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*), дикая форма № 3. Вверху — МС-скан в диапазоне 100–1700 m/z , внизу — спектры фрагментации (сверху вниз): МС2 протонированного иона мирицетина (319.19 m/z , красный ромб), МС3 фрагмента 319.19 → 219.13 m/z и МС4 фрагмента 319.19 → 219.13 → 191.12 m/z .

деленных из экстрактов плодов *L. caerulea* var. *kamtschatica* (табл. 1, Дополнительные материалы). 58 полифенольных соединений, представленных в ней, охватывают практически все классы полифенольных соединений: флавоны, флаванолы, флаван-3-олы, гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты, стильбены, танины, кумарины, лигнаны и т.д.

Несколько соединений было обнаружено впервые в ягодах данного вида жимолости. Это флавоны: гидроксигенистеин, диосметин-*O*-гексозид, хризоеириол-*O*-диглюкозид; флаванолы: гербацетин, мирицетин, астрагаллин, таксифолин-*O*-гексозид, рамноцитрин; флаван-3-олы: эпиафзелехин, эпикатехин-*O*-гексозид, эпигаллокатехин-эпикатехин димер; фенольные кислоты: гидроксиферуловая кислота, гидроксиметоксидиметилбензойная кислота, неохлорогеновая кислота, эллаговая кислота; стильбены пиносильвин, ресвератрол и многие другие полифенолы. На рис. 1 и 2 представлены масс-спектры идентифицированных полифенольных химических соединений, полученные в результате экспериментов. Масс-спектр флавонола мирицетина из экстракта *L. caerulea* var. *kamtschatica* (дикая форма № 3) представлен на рис. 2. $[M + H]^+$ ион продуцирует два фрагментарных иона с m/z 219.13 и m/z 273.09 (рис. 1). Далее дочерний ион с m/z 219.13 продуцирует ион с m/z 191.12. Это соединение в научной литературе по масс-спектрометрии идентифицировано как флавонол мирицетин в следующих растительных матрицах: андская голубика [15], клюква крупноплодная (*Vaccinium macrocarpon*) [19] и ферокактус голубеющий (*Ferocactus glaucescens*) [11].

Масс-спектр лигнана сирингарезинола из экстракта *L. caerulea* var. *kamtschatica* (сорт Елена) пред-

ставлен на рис. 2. $[M + H]^+$ ион продуцирует три фрагментарных иона при m/z 326.09, m/z 383.24, и m/z 153.17. Фрагментарный ион при m/z 326.09 порождает один дочерний ион при m/z 298.08. Данный фрагментарный ион продуцирует в свою очередь два дочерних иона при m/z 253.24 и m/z 127.14. Это соединение идентифицировано в научной литературе как лигнан сирингарезинол в экстрактах магнолии [40].

На рис. 3 представлена диаграмма Венна, ярко показывающая совпадения и расхождения по полифенольному составу 5 диких форм *L. caerulea* var. *kamtschatica* и сорта Елена. В табл. 2 показаны различия и совпадения по полифенольному составу в анализируемых экстрактах 5 диких форм жимолости и сорта Елена. Анализ данных показывает, что все 6 образцов показали абсолютное совпадение по следующим полифенольным соединениям: Kaempferol и Luteolin-7-*O*-glucoside. Наиболее богатым по содержанию полифенольных соединений показал себя сортобразец дикой формы № 5 — 23 соединения, далее следует сортобразец Елена — 21 соединение, и в порядке убывания: дикая форма № 1 — 19 соединений, дикая форма № 3 — 13 соединений, дикая форма № 4 — 12 соединений, дикая форма № 2 — 11 соединений. Наибольшее несовпадение по полифенольному составу с остальными представленными в эксперименте образцами показали сортобразец Елена — 13 соединений и дикая форма № 5 — 9 соединений.

Таким образом, результаты эксперимента показали, что ягоды жимолости камчатской содержат большое количество полифенольных соединений и других биологически активных субстанций. В данной работе нами впервые проведено метаболомное исследование образцов жимолости

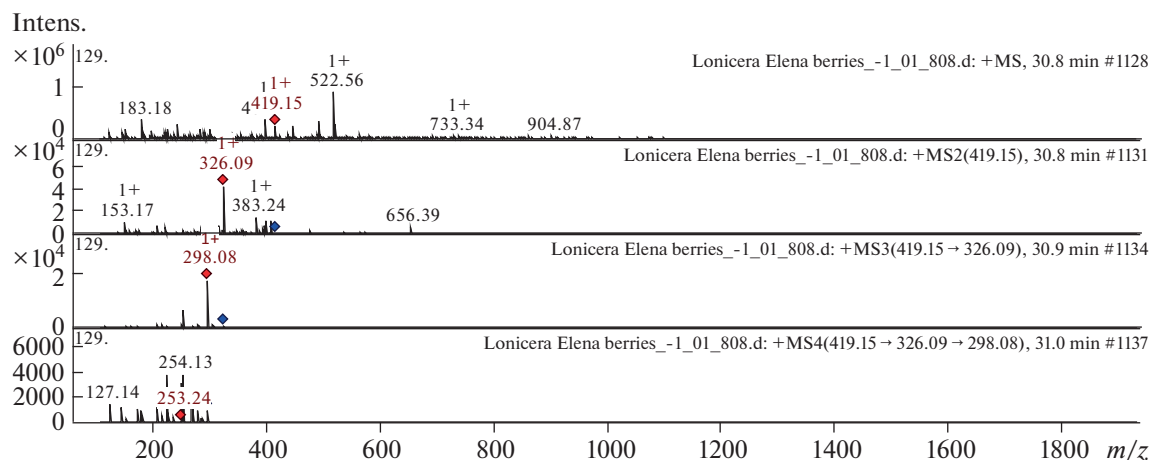


Рис. 2. Масс-спектры сингарезинола из экстракта ягод жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*), сортобразец Елена. Вверху — МС-скан в диапазоне 100–1700 m/z , внизу — спектры фрагментации (сверху вниз): МС2 протонированного иона сингарезинола (419.15 m/z , красный ромб), МС3 фрагмента 419.15 → 326.109 m/z и МС4 фрагмента 419.15 → 326.09 → 298.08 m/z .

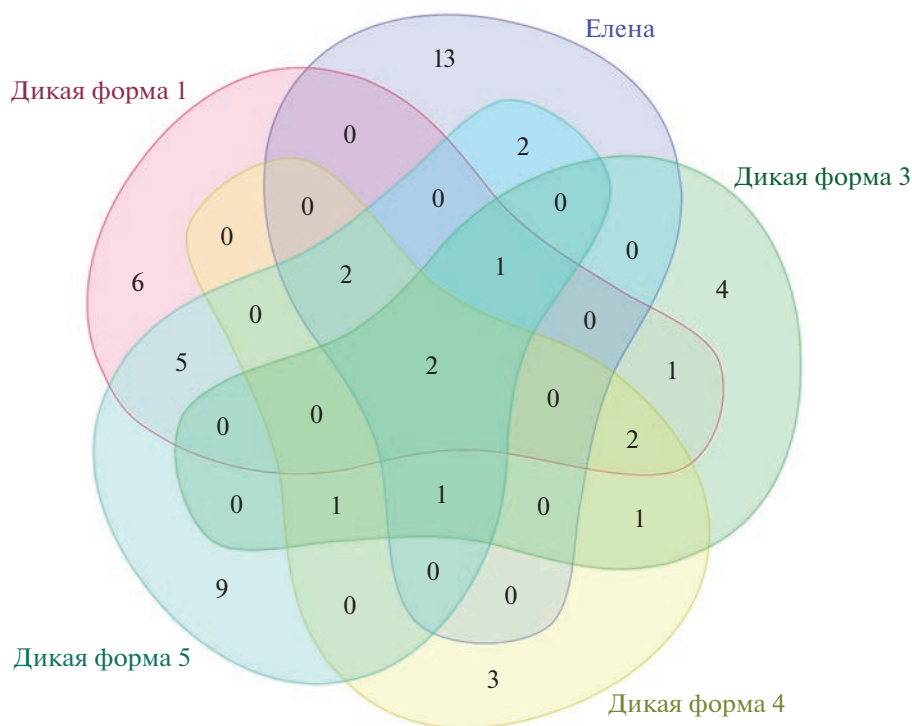


Рис. 3. Диаграмма Венна, показывающая расхождения по полифенольному составу ягод разных форм жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*).

L. caerulea var. *kamtschatica*, полученной как из диких образцов зон произрастания данного растения, так и из окультуренного сортобразца Елена. Результаты исследований показали присутствие 58 соединений полифенольного класса, соответствующих семейству *Caprifoliaceae*. В добавление к обнаруженным целевым соединениям некоторые соединения были идентифицированы впервые

в данных сортобразцах жимолости, в их числе, флавоны: гидроксигенистеин, диосметин-*O*-гексозид, хризоеиол-*O*-диглюкозид; флаванолы: гербацетин, мирицетин, астрагаллин, таксифолин-*O*-гексозид, рамноцитрин; флаван-3-олы: эпиафзелехин, эпикатехин-*O*-гексозид, димер эпигаллокатехин-эпикатехина; фенольные кислоты: гидроксиферуловая кислота, неохлорогеновая

Таблица 2. Распределение полифенольного состава в экстрактах ягод сортообразца Елена и диких форм (№ 1–5) жимолости камчатской (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*)

Сортообразцы	Количество совпавших соединений	Совпадения по химическим соединениям
Дикая форма 1, 2, 3, 4, 5, сорт Елена	2	Kaempferol; Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside
Дикая форма 1, 2, 3, 5, сорт Елена	1	Ellagic acid
Дикая форма 1, 2, 4, 5, сорт Елена	1	Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside
Дикая форма 1, 4, 5, сорт Елена	1	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside
Дикая форма 3, 4, 5, сорт Елена	1	(Epi)-catechin
Дикая форма 1, 2, 3, 4	1	Herbacetin
Дикая форма 1, 3, 4	1	(Epi)-afzelechin derivative
Дикая форма 2, 3, 4	1	Kaempferol-3- <i>O</i> -hexoside
Дикая форма 3, 4, 5	1	Myricetin
Дикая форма 5, сорт Елена	2	Hydroxyferulic acid; Quercetin
Дикая форма 1, 3	1	3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid
Дикая форма 1, 5	5	Kaempferol derivative; Delphinidin 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -sambubioside; Caffeoylquinic acid derivative; Proanthocyanidin B1; Taxifolin-3- <i>O</i> -hexoside
Дикая форма 2, 3	1	(Epi)-catechin derivative
Сорт Елена	13	Rutin; Phloretin; Syringaresinol; Hydroxy methoxy dimethylbenzoic acid; Rhamnocitrin; Chlorogenic acid; Pinosylvin; Diosmetin <i>O</i> -hexoside; Kaempferol-3,7-Di- <i>O</i> -glucoside; Delphinidin; <i>p</i> -Coumaroylquinic acid; Dihydroxy-tetramethoxy(iso)flavone; 2'-Hydroxygenistein
Дикая форма 1	6	Delphinidin 3-acetylglucoside; Chrysoeriol <i>O</i> -diglucoside; Epiafzelechin; 4-Methylesculetin; Resveratrol; Fraxetin
Дикая форма 2	3	Catechin; Astragalin; Quercetin pentosyl hexoside hexoside
Дикая форма 3	3	Protocatechuic acid; (Epi)-catechin derivative2; Petunidin
Дикая форма 4	3	Proanthocyanidin B-type; Cyanidin-3- <i>O</i> -rutinoside; Di- <i>O</i> -galloyl-HHDP-glucose
Дикая форма 5	9	(Epi) gallocatechin-(epi) catechin dimer; Isorhamnetin 3- <i>O</i> -6"- <i>O</i> -rhamnosyl-hexoside; 2,3,4,5,6-penta-hydroxybenzoic acid; (epi)Catechin <i>O</i> -hexoside; Quercetin deoxyhexosyl deoxyhexosyl hexoside; Ferulic acid- <i>O</i> -hexoside derivative; Dicafeoyl shiikimic acid; Neochlorogenic acid; Feruloyl- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl- <i>O</i> -caffeoylshikimic acid

кислота, эллаговая кислота; стильбены пиносильвин, ресвератрол и многие другие полифенолы. Наиболее богатым по содержанию полифенольных соединений был сортообразец дикой формы № 5 – 23 полифенольных соединения, далее следует сортообразец Елена – 21 полифенольное соединение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для дальнейшей селекции могут быть крайне интересны как дикие формы *L. caerulea* var. *kamtschatica*, так и уже окультуренные образцы. Необходимо дальнейшее более подробное изучение состава *L. caerulea* var. *kamtschatica* как по полифенольным группам, так и по соединени-

ям других химических классов. Полученные данные могут поддержать будущие исследования по производству различных фармацевтических и диетических добавок, содержащих экстракты *L. caerulea*. Широкий спектр биологически активных соединений дает большие возможности для создания новых пищевых и биологически активных добавок на основе экстрактов из семейства *Caprifoliaceae*.

Исследование выполнено в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении “Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов расте-

ний им. Н.И. Вавилова”, за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-74-00044.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гидзюк И.К. Синеплодная садовая жимолость. Томск: Издательство Томского университета, 1978. 153 с.
2. Якубов В.В., Чернягина О.А. Каталог флоры Камчатки (сосудистые растения). Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2004. 165 с.
3. Ильин В.С. Жимолость синяя // Помология. В пяти томах. Том V. Земляника. Малина. Орехоплодные и редкие культуры. Орел: ВНИИСПК, 2014. 587 с.
4. Петруша Е.Н. Хозяйственно-биологическая характеристика новых сортов жимолости селекции Камчатского НИИСХ // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т. 58. С. 273. <https://doi.org/10.31676/2073-4948-2019-58-273-278>
5. Петруша Е.Н. Изучение основных биохимических компонентов жимолости Камчатского края // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. 2021. № 4. С. 32. <https://doi.org/10.30850/vrsn/2021/4/32-34>
6. Соловьева Т.А., Петруша Е.Н. Жимолость на Камчатке. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2004. 48 с.
7. Куклина А.Г., Сорокопудов В.Н., Упадышев М.Т. Сорокопудова О.А., Прищепина Г.А. Состояние и перспективы селекции жимолости синей // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. 2017. № 5. С. 41.
8. Софронов А.П., Фурсова С.В., Головунин В.П. Жимолость синяя (*Lonicera caerulea* L.): технология и селекция. Киров: ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока, 2021. 64 с.
9. Фармакопея Евразийского экономического союза. Утверждена решением коллегии Евразийской экономической комиссии от 1 августа 2020 г. № 100.
10. Wojakowska A., Piasecka A., Garcia-Lopez P.M., Zamora-Natera F., Krajewski P., Marczak L., Kachlicki P., Stobiecki M. Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC–MS techniques // Phytochem. 2013. V. 92. P. 71. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.006>
11. Hamed A.R., El-Hawary S.S., Ibrahim R.M., Abdelmohsen U.R., El-Halawany A.M. Identification of chemopreventive components from halophytes belonging to Aizoaceae and Cactaceae through LC/MS – bioassay guided approach // J. Chrom. Sci. 2021. V. 59. P. 618. <https://doi.org/10.10193/chromsci/bmaa112>
12. Abeywickrama G., Debnath S.C., Ambigaipalan P., Shahidi F. Phenolics of selected cranberry genotypes (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their antioxidant efficacy // J. Agr. Food Chem. 2016. V. 64. P. 9342. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04291>
13. Jaiswal R., Muller H., Muller A., Karar M.G.E., Kuhnert N. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (*Caprifoliaceae*) leaves by LC–MSn. // Phytochem. 2014. V. 108. P. 252. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.023>
14. Cai Z., Wang C., Zou L., Liu X., Chen J., Tan M., Mei Y., Wei L. Comparison of multiple bioactive constituents in the flower and the caulis of *Lonicera japonica* Based on UFLC–QTRAP–MS/MS combined with multivariate statistical analysis // Molecules. 2019. V. 24. P. 1936. <https://doi.org/10.3390/molecules24101936>
15. Aita S.E., Capriotti A.L., Cavaliere C., Cerrato A., Giannelli Moneta B., Montone C.M., Piovesana S., Lagana A. Andean blueberry of the genus *Disterigma*: a high-resolution mass spectrometric approach for the comprehensive characterization of phenolic compounds // Separations. 2021. V. 8. P. 58. <https://doi.org/10.3390/separations8050058>
16. Zhao Y., Lu H., Wang Q., Liu H., Shen H., Xu W., Ge J., He D. Rapid qualitative profiling and quantitative analysis of phenolics in *Ribes meyeri* leaves and their antioxidant and antidiabetic activities by HPLC–QTOF–MS/MS and UHPLC–MS/MS // J. Sep. Sci. 2021. V. 44. P. 1404. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000962>
17. Li X., Tian T. Phytochemical characterization of *Mentha spicata* L. under differential dried-conditions and associated nephrotoxicity screening of main compound with organ-on-a-chip // Front. Pharmacol. 2018. V. 9: 1067. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01067>
18. Pandey R., Kumar B. HPLC–QTOF–MS/MS-based rapid screening of phenolics and triterpenic acids in leaf extracts of *Ocimum* species and their interspecies variation // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2016. V. 39. P. 225. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1148048>
19. Rafsanjany N., Senker J., Brandt S., Dobrindt U., Hensel A. In vivo consumption of cranberry exerts ex vivo antiadhesive activity against fimH-dominated uropathogenic *Escherichia coli*: a combined in vivo, ex vivo, and in vitro study of an extract from *Vaccinium macrocarpon* // J. Agric. Food Chem. 2015. V. 63. P. 8804. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03030>
20. Ieri F., Martini S., Innocenti M., Mulinacci N. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. // Phytochem. Anal. 2013. V. 24. P. 467. <https://doi.org/10.1002/pca.2462>
21. Abu-Reidah I.M., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Arraes-Roman D., Segura-Carretero A. HPLC–DAD–ESI–MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits // Food Chem. 2015. V. 166. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
22. Mena P., Calani L., Dall'Asta C., Galaverna G., Garcia-Viguera C., Bruni R., Crozier A., Del Rio D. Molecules. 2012. V. 17. P. 14821. <https://doi.org/10.3390/molecules171214821>
23. Burgos-Edwards A., Jimenez-Aspee F., Theoduloz C., Schmeda-Hirschmann G. Colonic fermentation of polyphenols from Chilean currants (*Ribes* spp.) and its ef-

- fect on antioxidant capacity and metabolic syndrome-associated enzymes // Food Chem. 2018. V. 30. P. 144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.053>
24. Yin N.-W., Wang S.-X., Jia L.-D., Zhu M.-C., Yang J., Zhou B.-J., Yin J.-M., Lu K., Wang R., Li J.-N., Qu C.-M. Identification and characterization of major constituents in different-colored rapeseed petals by UPLC–HESI-MS/MS // Agric. Food Chem. 2019. V. 67. P. 11053. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05046>
 25. Ismail W.M., Ezzat S.M., Aliaa E.M.K., El-Mosallamy, Kadriya S., El Deeb, El-Fishawy A.M. In vivo antihypertensive activity and UHPLC-Orbitrap-HRMS profiling of *Cuphea ignea* A. DC. // ACS omega. 2022. V. 7. P. 46524. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05356>
 26. Liu P., Lindstedt A., Markkinen N., Sinkkonen J., Suomela J., Yang B. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 12015. <https://doi.org/10.1021/jf503521m>
 27. Razgonova M.P., Tekutyeva L.A., Podvolotskaya A.B., Stepanchikina V.D., Zakharenko A.M., Golokhvast K.S. *Zostera marina* L. supercritical CO₂-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents recovered from seagrass // Separations. 2022. V. 9. P. 182. <https://doi.org/10.3390/separations9070182>
 28. Flamini R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols // Int. Sch. Res. Notices. 2013. Article ID 813563. <https://doi.org/10.1155/2013/813563>
 29. Chen Y., Cai X., Li G., He X., Yu X., Yu X., Xiao Q., Xiang Z., Wang C. Chemical constituents of radix *Actinidia chinensis* planch by UPLC–QTOF–MS // Biomed. Chromatogr. 2021. V. 35:e5103. <https://doi.org/10.1002/bmc.5103>
 30. Singh J., Kumar S., Rath B., Bhrara K., Chhikara B.S. Therapeutic analysis of *Terminalia arjuna* plant extracts in combinations with different metal nanoparticles // J. Mater. NanoSci. 2015. V. 2. P. 1.
 31. Ruiz A., Hermosin-Gutierrez I., Vergara C., von Baer D., Zapata M., Hitschfeld A., Obando L., Mardones C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS // Food Res. Int. 2013. V. 51. P. 706. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.043>
 32. Fermo P., Comite V., Sredojevic M., Ciric I., Gasic U., Mutic J., Baosic R., Tesic Z. Elemental analysis and phenolic profiles of selected Italian wines // Foods. 2021. V. 10. P. 158. <https://doi.org/10.3390/foods10010158>
 33. Ruiz A., Hermosin-Gutierrez I., Mardones C., Vergara C., Herlitz E., Vega M., Dorau C., Winterhalter P., von Baer D. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile // Agric. Food Chem. 2010. V. 51. P. 706. <https://doi.org/10.1021/jf100173x>
 34. Zengin G., Mahomoodally M.F., Sinan K.I., Ak G., Etienne O.K., Sharmeen J.B., Brunetti L., Leone S., Di Simone S.C., Recinella L., Chiavaroli A. Chemical composition and biological properties of two *Jatropha* species: different parts and different extraction methods // Antioxidants. 2021. V. 10. P. 792. <https://doi.org/10.3390/antiox10050792>
 35. Razgonova M.P., Bazhenova B.B., Zabalueva Y.Y., Burkhanova A.G., Zakharenko A.M., Kupriyanov A.N., Sabitov A.S., Ercisli S., Golokhvast K.S. *Rosa davurica* Pall., *Rosa rugosa* Thumb., and *Rosa acicularis* Lindl. originating from Far Eastern Russia: Screening of 146 chemical constituents in tree species of the genus *Rosa* // Applied Sci. 2022. V. 12: 9401. <https://doi.org/10.3390/app12199401>
 36. Bujor O.-C. Extraction, identification and antioxidant activity of the phenolic secondary metabolites isolated from the leaves, stems and fruits of two shrubs of the Ericaceae family. PhD THESIS. 2016. <https://theses.hal.science/tel-01722698/>
 37. Said R.B., Hamed A.I., Mahalel U.A., Al-Ayed A.S., Kowalczyk M., Moldoch J., Oleszek W., Stochmal A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18: 512. <https://doi.org/10.3390/ijms18030512>
 38. Ekeberg D., Flate P.-O., Eikenes M., Fongen M., Naess-Andresen C.F. Qualitative and quantitative determination of extractives in heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by gas chromatography // J. Chromatogr. A 2006. V. 1109. P. 267. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.027>
 39. Zhu X.X., Yang L., Li Y.J., Zhang D., Chen Y., Kostecka P., Kmonickova E., Zidek Z. Effects of sesquiterpene, flavonoid and coumarin types of compounds from *Artemisia annua* L. on production of mediators of angiogenesis // Pharmacol. Rep. 2013. V. 65. P. 410.
 40. Guo K., Tong C., Fu Q., Xu J., Shi S., Xiao Y. Identification of minor lignans, alkaloids, and phenylpropanoid glycosides in *Magnolia officinalis* by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2019. V. 170. P. 153. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.044>

УДК 581.1

ФЛАВОНОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ РОДА *Nigella* L.

© 2023 г. С. Н. Шиш^а, *, П. С. Шабуня^б, С. А. Фатыхова^б,
В. Н. Решетников^а, Е. В. Спиридович^а, **

^аЦентральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

^бГосударственное научное учреждение “Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси”,
Минск, Республика Беларусь

*e-mail: svetlana.shysh@gmail.com

**e-mail: a.spirydovich@gmail.com

Поступила в редакцию 18.09.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 09.11.2023 г.

Фенольные соединения у растений рода *Nigella* представлены различными группами флавоноидов, галлокатахинами, производными коричной и кофейной кислот. Определяли содержание флавоноидных гликозидов в листьях чернушки дамасской (*Nigella damascena* L.), чернушки посевной (*N. sativa* L.) и чернушки восточной (*N. orientalis* L.) методом ВЭЖХ-МС. Установлена видоспецифическая зависимость накопления флавоноидных гликозидов. Показано, что основными флавоноидами в листьях исследованных объектов являлись гликозиды кверцетина и кемпферола, при этом гликозидов кверцетина в изучаемых экстрактах было в 1.40–1.97 раза больше, чем кемпферола. Листья *N. sativa* имели повышенный состав флавоноидных гликозидов по отношению к другим изучаемым видам. Качественный состав флавоноидных гликозидов *N. damascena* был подобен *N. sativa*, тогда как по общему содержанию этой группы соединений он близок к *N. orientalis*. Суммарное количество флавоноидных гликозидов в экстрактах листьев *N. sativa* было в 4 раза выше, чем в экстрактах других видов чернушки. Стоит отметить, что виды *N. sativa* и *N. damascena* имеют наибольшее фенотипическое сходство и более устойчивы к условиям произрастания в Беларуси, в то время как вид *N. orientalis* отличается внешне и более требователен к условиям культивирования. Было установлено, что в листьях *N. orientalis* разнообразие флавоноидных гликозидов меньше, при отсутствии высокомолекулярных и ацилированных форм. Возможно отсутствие ацилированных производных и меньшее разнообразие флавоноидных гликозидов сказывается на низкой устойчивости *N. orientalis* к абиотическим факторам и снижает его адаптационный потенциал.

Ключевые слова: *Nigella damascena* L., *Nigella orientalis* L., *Nigella sativa* L., гликозиды, листья, флавоноиды

DOI: 10.31857/S001533032360078X, EDN: ZQOXKH

ВВЕДЕНИЕ

Растения рода чернушка (*Nigella* L.) характеризуются синтезом разнообразных биологически активных соединений, относящихся к различным химическим классам: летучие соединения терпеновой природы, сапонины, алкалоиды, жирные кислоты, фенольные кислоты и флавоноиды. Род чернушка насчитывает более 20 видов, но наибольшее внимание привлекают чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), чернушка посевная (*N. sativa* L.) и чернушка восточная (*N. orientalis* L.).

Семена *N. sativa* известны в мире под названием черный тмин. Они обладают перечным вкусом и мускатным запахом благодаря наличию эфирных масел и тимохинона, и широко используются в народной медицине [1].

N. damascena родом из Северной Африки. В настоящее время ее выращивают в Европе, Ма-

лой Азии и Индии как декоративное и пряно-ароматическое растение [2, 3]. Семена чернушки дамасской отличаются сильным ароматом с оттенком земляники и широко применяются в Юго-Восточной Азии в качестве пряности [4], надземная биомасса (верхушки генеративных побегов, листья, цветки и семена) являются сырьем для пищевой и фармацевтической промышленности [5].

N. orientalis произрастает в Малой Азии и на Кавказе, встречаясь там в посевах и по горным склонам [6]. Используется как декоративное растение в мавританских газонах, цветниках, для срезки в букеты и как флористический материал для летне-осенних и зимних композиций [7–9].

Фитохимический состав семян *N. sativa* довольно разнообразен и широко изучен [10–13], в то время как другая надземная часть растения ис-

следуется не так часто. Учеными биотехнологического центра Туниса был установлен качественный состав фенольных соединений чернушки посевной, который включал фенольные кислоты (галловую, *p*-гидроксibenзойную, хлорогеновую и др.) и флавоноиды (эпикатехин, кверцетин, апигенин и др.) [5].

У *N. damascena* подробно определен качественный и количественный состав полифенолов семян и проведено его сравнение с таковым семян чернушки посевной [4]. Отмечена схожесть качественного состава соединений фенольной природы у двух видов чернушки: основными соединениями являются гидроксибензойная и кофейная кислоты. Также обнаружены ванилиновая, сиреневая, галловая, *n*-кумаровая кислоты, катехин и отмечены незначительные количества коричной кислоты и кверцетина. Несмотря на идентичность качественного состава фенольных соединений семян чернушки посевной и дамасской авторы указали на количественные различия в биосинтезе отдельных соединений.

У *N. orientalis* достаточно хорошо изучены эфирные масла семян [7–9], в то время как экстракты листьев — недостаточно.

Учитывая литературные данные и результаты наших исследований по содержанию фенольных соединений в семенах растений рода *Nigella*, был проведен скрининг общего пула фенольных соединений в листьях и траве [14]. Было установлено, что листья разных видов чернушки содержали от 1.16 до 1.77 г/100 г сухого веса фенольных соединений, в то время как семена — от 0.55 до 1.26 г/100 г сухого веса. Относительно высокое содержание фенольных соединений в листьях позволяет предложить их использование в качестве источника биологически активных веществ. В связи с этим, актуально было проведение сравнительного анализа качественного и количественного состава фенольных соединений в листьях разных видов чернушки, и установление взаимосвязи между характером их ростовых процессов и накоплением флавоноидных гликозидов.

Целью данной работы было изучение группы флавоноидных гликозидов в листьях растений рода *Nigella*, выращенных в условиях Центральной Беларуси. Мы полагаем, что определение качественного и количественного состава флавоноидных гликозидов и установление наличия видоспецифических зависимостей накопления этих веществ позволит установить взаимосвязь между содержанием отдельных флавоноидных гликозидов и особенностями ростовых процессов у разных видов чернушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили растения трех видов: чернушка дамасская (*Nigella dama-*

scena L.), чернушка восточная (*N. orientalis* L.) и чернушка посевная (*N. sativa* L.), выращенные на экспериментальном участке лаборатории прикладной биохимии Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Для количественного и качественного определения состава флавоноидных гликозидов использовали листья, собранные в фазу цветения, и высушенные до воздушно-сухого состояния. Растения выращивали в условиях мелкоделяночного полевого опыта рядовым способом, в одинаковых условиях по увлажнению, составу почвы и агротехническим мероприятиям. Экспериментальная выборка состояла из 100 растений, с каждого растения были взяты по 2 листа, высушены и гомогенизированы, полученный порошок использован для экстракции.

Получение экстрактов для анализа. Для экстракции использовали воздушно-сухое измельченное сырье, масса навески 2 г (точная навеска). Соотношение образца и экстрагента (г/мл) составляло 1 : 80. Экстракцию образцов проводили двумя способами. Первый способ включал двухступенчатую (по 40 мин) экстракцию 70% этанолом на водяной бане при 80°C, тогда как второй — экстракцию 2М HCl и 96% этанолом (соотношение 1 : 1) на водяной бане при 80°C в течение 120 мин.

По первому способу — полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр. Аликвоты (1 мл) экстрактов без гидролиза фильтровали через шприцевой мембранный фильтр в хроматографические вials и использовали для ВЭЖХ-МС анализа.

По второму способу — экстракты после кислотного гидролиза дополнительно гидролизировали при следующих условиях: 800 мкл образцов с HCl + 200 мкл конц. HCl (конечная концентрация в растворе около 3 М), затем инкубировали 2 ч в плотно закрытой хроматографической вiale при температуре 98°C.

Описание ВЭЖХ-МС метода анализа. Для идентификации и количественного анализа фенольных соединений использовали метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-детектором. Разделение компонентов проб проводили на колонке Agilent Zorbax XDB C18 (4.6 × 150 мм, 5.0 мкм) при температуре 40°C на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., USA). Подвижная фаза состояла из двух растворителей: А — 0.1% муравьиная кислота (об/об) в воде и В — 0.1% муравьиная кислота (об/об) в ацетонитриле. Для анализа негидролизированных образцов использовали следующий градиент режима элюирования: процент растворителя В в подвижной фазе увеличивался от 5 до 25% за 20 мин, затем за следующие 10 мин — до 40%, а в 35 мин составлял 90%. Для гидролизированных образцов процентный состав растворителей в по-

Таблица 1. Содержание кверцетина и кемпферола в экстрактах листьев различных видов чернушки после кислотного гидролиза

Агликон	Содержание, г/100 г сухого веса		
	<i>N. sativa</i>	<i>N. damascena</i>	<i>N. orientalis</i>
Кверцетин	0.055* ± 0.001	0.043* ± 0.0008	0.057* ± 0.001
Кемпферол	0.039* ± 0.0007	0.027* ± 0.0006	0.029* ± 0.001

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей. Звездочка “*” означает, что значения достоверно отличаются при $P \leq 0.05$.

движной фазе изменялся за первые 10 мин от 5 до 25% растворителя В, увеличивался до 40% за 5 мин и оставался таким же в следующие 3 мин, в 25 мин составил 90%. Скорость потока элюента — 0.5 мл/мин. Детекция велась при длине волны 270 нм. Объем инъекции — 10 мкл (для количественного анализа) и 20 мкл (для качественного анализа). Температура в автосамплере 15°C. Хроматограф был онлайн сопряжен с tandemным масс-спектрометром Agilent 6410 Triple Quad (тройной квадруполь) (Agilent Technologies Inc., USA). В качестве интерфейса ионизации электрораспылением использовался Agilent G1948B API-ES (Agilent Technologies Inc., USA) в режиме отрицательных и положительных ионов. Для идентификации использовали режимы общего сканирования ионов в диапазоне масс от 100 до 1500 Д (MS2 Scan) и получения дочерних ионов (Product ion) из ионов с m/z , соответствующим $[M + H]^+$ для молекулярных масс соединений в изучаемых экстрактах. Энергия в ячейке соударений при получении дочерних ионов варьировала от 15 до 45 В. Параметры работы масс-детектора: температура осушающего газа 350°C, скорость потока осушающего газа 7 л/мин, давление на распылителе 40 psi, напряжение на капилляре 4000 В, напряжение на фрагменторе 135 В (положительные ионы) и 200, 220 В (отрицательные ионы). Обработку хроматограмм с УФ- и масс-детекторов проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 и Agilent ChemStation (Agilent Technologies Inc., USA).

Растворы стандартов кемпферола ($\geq 97\%$, Sigma), кверцетин дигидрат ($\geq 99\%$ HPLC, Extrasynthese) готовили в концентрациях 0.3–0.4 мг/мл в метаноле. Растворы для калибровочной кривой был в диапазоне концентраций от 7.5 до 150 мкг/мл. Для количественного анализа агликонов в образцах после гидролиза и фенольных соединений в негидролизированных образцах использовали хроматограммы с УФ-детектора. Содержание кемпферола и кверцетина рассчитывали по калибровочной кривой для соответствующих стандартов, флавоноидные гликозиды — по калибровочной кривой для кверцетина.

Математическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel.

Проверка гипотезы о равенстве двух средних проводилась с помощью t -критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде средних значений 3 биологических повторностей и их стандартных ошибок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенольные соединения у растений рода *Nigella* представлены различными группами флавоноидов, галлокатехинами, производными коричной и кофейной кислот. При этом для *N. sativa* и *N. glandulifera* было отмечено присутствие разнообразных по составу и строению гликозидов кверцетина и кемпферола в экстрактах семян и надземных частей растения [5, 11, 15–18]. ВЭЖХ-МС анализ метанольных экстрактов листьев чернушки трех изучаемых видов позволил предварительно идентифицировать гликозиды кверцетина и кемпферола. Для подтверждения наличия в составе гликозидов именно этих агликонов был проведен кислотный гидролиз и последующий ВЭЖХ-МС анализ. Кемпферол и кверцетин в гидролизированных образцах были идентифицированы путем сравнения со стандартами этих веществ (времена выхода и масс-спектры), их количественная оценка в экстрактах представлена в табл. 1.

На рис. 1 представлена хроматограмма с УФ-детектора при $\lambda = 270$ нм для негидролизованного экстракта чернушки посевной (проинтегрированы пики основных флавоноидных гликозидов). Анализ масс-спектров в пиках на хроматограммах общего ионного тока в режиме генерации отрицательных и положительных ионов позволил предположить возможные молекулярные массы (мол. м.) и фрагменты основных соединений (табл. 2, 3).

Пики, приведенные в табл. 2, с временами удерживания (RT — retention times) 14.8, 15.3, 16.3, 16.7, 20.2 и 20.6 мин характеризуются одинаковой мол. м. 950 Д. В режиме генерации отрицательных ионов в масс-спектрах этих пиков были найдены ионы с m/z 949 = $[M - H]^-$, в режиме положительных ионов $-m/z$ 973 = $[M + Na]^+$, m/z 789 = $[M + H - 162]^+$, m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 162]^+$ (табл. 3). Потеря фрагмента 162 Д характерна при отщеплении

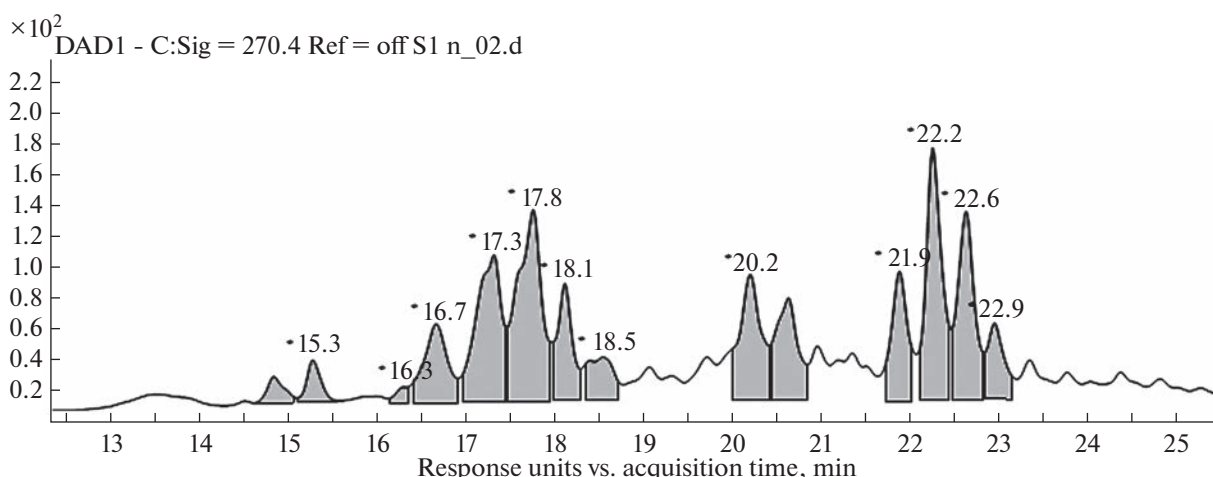


Рис. 1. УФ-хроматограмма экстракта листьев *Nigella sativa* L.

дегидратированной гексозы. Масс-спектр дочерних ионов при положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 627 = $[M + H-162-162]^+$, m/z 465 = $[M + H-162-162-162]^+$, m/z 303 = $[M + H-162-162-162-162]^+$. Фрагмент с величиной m/z 303 соответствовал остатку агликона кверцетина, что было дополнительно подтверждено обнаружением кверцетина в гидролизованных об-

разцах. Присутствующие в масс-спектрах ионы с m/z 325 = $[162 + 162 + H]^+$ и m/z 163 = $[162 + H]^+$ представляли собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Таким образом, эти соединения являются гликозидами кверцетина и 4 гексоз.

Пики с временами удерживания 17.3, 17.8 и 18.1 мин соответствовали веществам с одинаковой

Таблица 2. Флавоноидные гликозиды в экстракте листьев *Nigella sativa* L.

RT, мин	Предполагаемая структура вещества	мол. м., Д	Содержание, г/100 г сухого веса
14.8	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.08 ± 0.008
15.3	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.03 ± 0.002
16.3	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.18 ± 0.002
16.7	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.34 ± 0.01
17.3	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.41 ± 0.01
17.8	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.17 ± 0.003
18.1	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	1.25 ± 0.006
18.5	Гликозид кемпферола и 3 гексоз	772	0.29 ± 0.003
20.2	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.21 ± 0.003
20.6	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.20 ± 0.006
21.9	Гликозид кверцетина и 3 гексоз и рамнозы	934	0.21 ± 0.003
22.3	Гликозид кверцетина и 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	
	Ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и 3 гексоз	994	0.35 ± 0.005
22.6	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	
	Ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и 3 гексоз	994	0.28 ± 0.009
22.9	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	0.02 ± 0.001
	Сумма		4.02

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей при уровне значимости $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Масс-спектрометрическая характеристика основных флавоноидных гликозидов

Название	мол. м., Д	Основные m/z в пике	
		ESI Negative	ESI Positive
Гликозид кемпферола и 2 гексоз	610	609, 483	633, 449, 287
Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	625, 300	649, 627, 465, 303, 163, 145
Гликозид кверцетина	712	667, 689, 300	713, 735, 303
Гликозид кемпферола и 3 гексоз	772	771	795, 450, 287, 163
Гликозид кверцетина, 2 гексоз и рамнозы	772	771, 300	773, 795, 303
Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	787, 625	789, 811, 465, 325, 303, 163
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и малоновой кислоты	874	873	875, 713, 465, 303
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	933, 301, 271	957, 465, 309, 303, 163, 147
Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	949	973, 789, 465, 325, 303, 163
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и глюкуроновой или феруловой кислоты	964	963	987, 501, 465, 339, 303, 177
Ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и 3 гексоз	994	993	844, 531, 465, 369, 303, 207
Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	1079, 300	1081, 449, 309, 303
Гликозид кверцетина, 4 гексоз и рамнозы	1096	1095, 300	1119, 1097, 949, 633, 471, 465, 309, 303, 301, 165, 147
Гликозид кверцетина, 4 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	1126	1125	1127, 1149, 303, 465

мол. м. 788 Д. В масс-спектрах этих соединений, полученных при отрицательной ионизации, присутствовали ионы с m/z 787 = $[M-H]^-$, m/z 625 = $[M-H-162]^-$, в режиме положительных ионов – m/z 811 = $[M+Na]^+$, m/z 789 = $[M+H]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162]^+$. Масс-спектр дочерних ионов при положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 627 = $[M+H-162]^+$, m/z 465 = $[M+H-162-162]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162]^+$ (рис. 2а). Учитывая характерную фрагментацию с отщеплением фрагмента с мол. м. 162 Д и наличие иона агликона (мол. м. 303 Д), можно предположить, что эти соединения представляют собой гликозиды кверцетина и трех гексоз.

Пик с RT 18.5 мин содержал вещество с мол. м. 772 Д, что подтверждается наблюдаемыми в масс-спектрах ионами с m/z 771 = $[M-H]^-$ (отрицательная ионизация) и m/z 795 = $[M+Na]^+$ (положительная ионизация). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 449 = $[M+H-162-162]^+$, m/z 287 = $[M+H-162-162-162]^+$. Фрагмент с величиной m/z 287 соответствовал остатку агликона кемпферола, что было дополнительно подтверждено его обнаружением в гидролизированных образцах. Таким образом, это соединение – гликозид кемпферола и трех гексоз (табл. 2).

Пики с временами удерживания 21.9, 22.3 и 22.6 мин соответствовали соединениям с одинаковой мол. м. 934 Д. В режиме отрицательных

ионов были получены ионы с m/z 933 = $[M-H]^-$, в режиме положительных ионов – m/z 957 = $[M+Na]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M+H-162-162-146]^+$ и m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146]^+$. Потеря фрагмента 162 Д характерна при отщеплении дегидратированной гексозы. Фрагмент молекулы с нейтральной потерей 146 Д может образовываться при отщеплении рамнозы ($-H_2O$). Ионы с m/z 309 = $[146+162+H]^+$, m/z 325 = $[162+162+H]^+$, m/z 163 = $[162+H]^+$, m/z 147 = $[146+H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида (табл. 3). Учитывая характерную фрагментацию с отщеплением фрагмента с мол. м. 162 Д и 146 Д и наличие иона агликона (303 Д), можно предположить, что эти соединения представляют собой гликозиды кверцетина, трех гексоз и одной рамнозы.

Надо отметить, что пики с временами удерживания 22.3 и 22.6 мин являются смесью не разделившихся веществ, поэтому, помимо соединений с мол. м. 934 Д в этих же пиках присутствуют вещества с мол. м. 964 Д, которые есть и в пике с RT 22.9 мин. В режиме отрицательных ионов в масс-спектрах этих соединений обнаружены ионы с m/z 963 = $[M-H]^-$, в режиме положительных ионов – m/z 987 = $[M+Na]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-176]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в

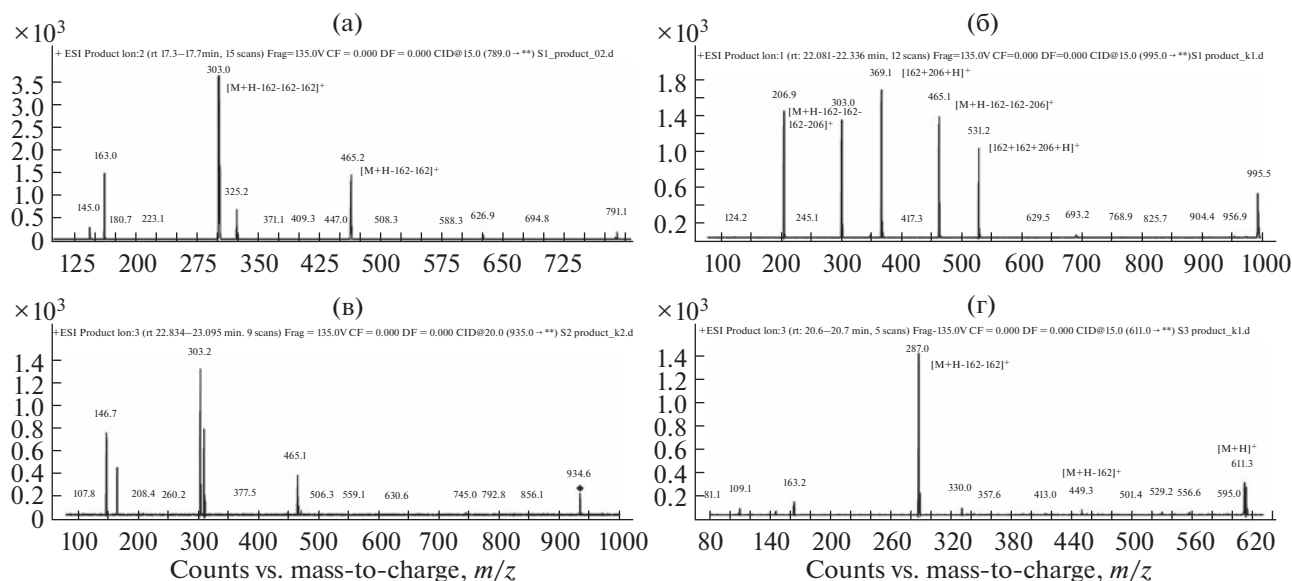


Рис. 2. Масс-спектры в режиме получения дочерних ионов: а — из m/z 789 для *Nigella sativa*; б — из m/z 995 для *Nigella sativa*; в — из m/z 935 для *N. damascena*; г — из m/z 611 для *N. orientalis*.

положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M + H - 162 - 162 - 176]^+$ и m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 176]^+$. Потеря фрагмента 176 Д может происходить при отщеплении либо остатка феруловой ($-H_2O$), либо остатка глюкуроновой кислоты ($-H_2O$). Агликон соответствует кверцетину (m/z 303). Ионы с m/z 339 = $[176 + 162 + H]^+$, m/z 501 = $[162 + 162 + 176 + H]^+$; m/z 177 = $[176 + H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации остатков сахаров и кислот, входящих в состав гликозида. Поэтому можно предположить, что эти соединения — гликозиды кверцетина, трех гексоз и одной молекулы феруловой или глюкуроновой кислоты. Также в пиках с временами удерживания 22.3 и 22.6 мин присутствовали вещества с мол. м. 994 Д, что подтверждается наличием ионов с m/z 993 = $[M - H]^-$ (отрицательная ионизация) и m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 206]^+$ (положительная ионизация). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M + H - 162 - 162 - 206]^+$, m/z 303 = $[M + H - 162 - 162 - 162 - 206]^+$ (рис. 2б). Агликон соответствует кверцетину (m/z 303). Ионы с m/z 369 = $[162 + 206 + H]^+$, m/z 531 = $[162 + 162 + 206 + H]^+$, m/z 207 = $[206 + H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида (табл. 3). Полученные результаты согласуются с работой исследователей Технического университета в Лиссабоне [19]. Потеря фрагмента с m/z 206 соответствует ацильной группе, представленной синаповой кислотой. Таким образом, это соединение представляет собой ацилированный синаповой кислотой гликозид кверцетина и

трех гексоз. Наши данные согласуются с литературными, так в экстрактах чернушки различных видов исследователями из Туниса, Италии, Боснии и Герцеговины, а также Чехии отмечено присутствие феруловой и синаповой кислот [5, 11, 15].

Для экстракта *N. damascena* на рис. 3 представлена хроматограмма с УФ-детектора при $\lambda = 270$ нм, на которой проинтегрированы пики основных флавоноидных гликозидов. Анализ масс-спектров пиков в режиме генерации отрицательных и положительных ионного тока позволил определить молекулярные массы и фрагменты основных соединений (табл. 2–4).

Пик с RT 16.1 мин соответствовал соединению с мол. м. 950 Д, с фрагментацией, аналогичной описанной для гликозидов кверцетина и четырех молекул гексоз в *N. sativa*. Вещества с временами удерживания 17.3, 22.5 и 22.9 мин имеют одинаковую мол. м. 934 Д и фрагментацию как гликозиды кверцетина, трех гексоз и одной рамнозы (рис. 2в). Для вещества с временем удерживания 18.4 мин и мол. м. 788 Д характерна фрагментация как для гликозидов кверцетина и трех гексоз в *N. sativa*. Соединения с временами удерживания 22.9 и 23.2 мин и мол. м. 964 Д имели масс-спектры аналогичные гликозиду кверцетина, трех гексоз и одной молекулы феруловой или глюкуроновой кислоты, как в экстракте *N. sativa*.

Пики с временами удерживания 17.3 и 17.7 мин (табл. 4) содержали вещества с одинаковой мол. м. 772 Д, и были предположительно идентифицированы как гликозиды кверцетина, двух гексоз и одной рамнозы, т. к. в режиме отрицательной ионизации были зарегистрированы ионы с m/z 771 =

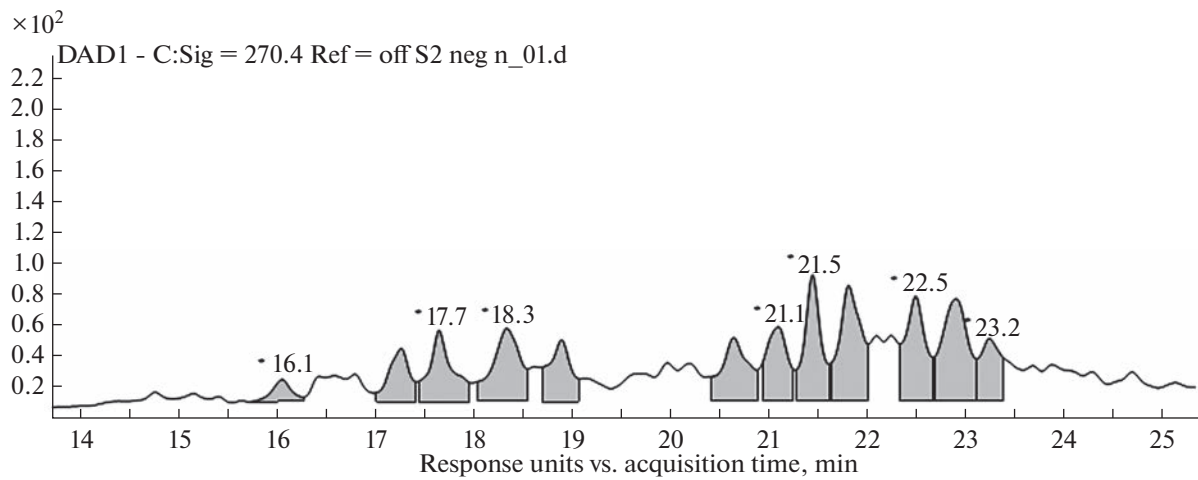


Рис. 3. УФ-хроматограмма экстракта листьев *Nigella damascena* L.

= [M–H][–], а в режиме положительной – m/z 795 = [M + Na]⁺, m/z 773 = [M + H]⁺, m/z 303 = [M + H-162-162-146]⁺. Агликон соответствовал кверцетину (m/z 303).

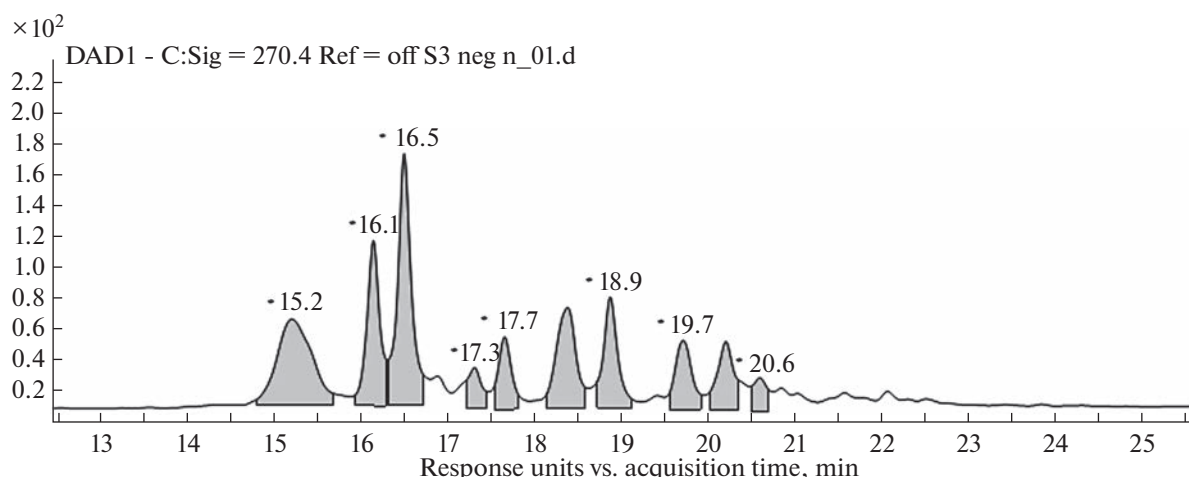
Соединения с временами удерживания 184 и 18.9 мин имели мол. м. 626 Д. В режиме отрица-

тельных ионов были зарегистрированы ионы с m/z 625 = [M–H][–], в режиме положительных ионов – m/z 649 = [M + Na]⁺, m/z 627 = [M + H]⁺, m/z 465 = [M + H-162]⁺, m/z 303 = [M + H-162-162]⁺. Агликон соответствовал кверцетину (m/z 303) и можно предположить, что эти соединения – гликозиды кверцетина и двух гексоз.

Таблица 4. Флавоноидные гликозиды в экстракте листьев *Nigella damascena* L.

RT, мин	Предполагаемая структура вещества	мол. м., Д	Содержание, г/100 г сухого веса
16.1	Гликозид кверцетина и 4 гексоз	950	0.04 ± 0.001
17.3	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 2 гексоз и рамнозы	772	0.05 ± 0.005
17.7	Гликозид кверцетина, 2 гексоз и рамнозы	772	0.06 ± 0.001
18.4	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	
	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.09 ± 0.002
18.9	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	0.06 ± 0.002
20.7	Гликозид кверцетина, 4 гексоз и рамнозы	1096	0.08 ± 0.002
21.1	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	
	Гликозид кверцетина, 4 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	1126	0.09 ± 0.001
21.5	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	0.13 ± 0.003
21.8	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	0.16 ± 0.004
22.5	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	0.13 ± 0.002
22.9	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и рамнозы	934	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	964	0.17 ± 0.001
23.2	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и феруловой или глюкуроновой кислоты	964	
	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и 2 рамноз	1080	0.11 ± 0.003
	Сумма		1.17

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей при уровне значимости $P \leq 0.05$.


 Рис. 4. УФ-хроматограмма экстракта листьев *Nigella orientalis* L.

Вещества с временами удерживания 21.1; 21.5 и 21.8 мин характеризовались одинаковой мол. м. 1080 Д, что подтверждается полученными в режиме отрицательной ионизации ионами с m/z 1079 = $[M-H]^-$ и m/z 300 = $[M-2H-162-162-162-146-146]^-$; в режиме положительной ионизации — m/z 1081 = $[M+H]^+$, m/z 465 = $[M+H-162]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146-146]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 611 = $[M+H-162-162-146]^+$, m/z 449 = $[M+H-162-162-162-146]^+$, m/z 465 = $[M+H-162-162-146-146]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-146-146]^+$. Ионы с m/z 309 = $[146+162+H]^+$ и m/z 147 = $[146+H]^+$ представляли собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Агликон соответствует кверцетину. Предположительно эти вещества — гликозиды кверцетина, трех гексоз и двух рамноз.

Вещество с мол. м. 1096 Д имело время удерживания 20.7 мин. Присутствовали ионы с m/z 1095 = $[M-H]^-$, m/z 300 = $[M-2H-162-162-162-146]^-$ в режиме отрицательной ионизации и m/z 1119 = $[M+Na]^+$, m/z 1097 = $[M+H]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-146]^+$ в режиме положительной ионизации. Агликон соответствует кверцетину (m/z 303). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 465 = $[M+H-162-162-162-146]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-146]^+$. Ионы с m/z 309 = $[146+162+H]^+$, m/z 147 = $[146+H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Таким образом, это соединение представляет собой гликозид кверцетина, четырех гексоз и одной рамнозы.

В масс-спектре вещества с временем удерживания 21.1 мин в режиме отрицательных ионов

присутствовали ионы с m/z 1125 = $[M-H]^-$, m/z 300 = $[M-2H-162-162-162-162-176]^-$, а в режиме положительных ионов — m/z 1149 = $[M+Na]^+$, m/z 1127 = $[M+H]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-176]^+$, и соответственно, его молекулярная масса составляет 1126 Д. Агликоном является кверцетин. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 664 = $[M+Na-162-162-162]^+$, m/z 465 = $[M+H-162-162-162-176]^+$, m/z 303 = $[M+H-162-162-162-162-176]^+$. Ионы с m/z 339 = $[176+162+H]^+$, m/z 501 = $[162+162+176+H]^+$; m/z 177 = $[176+H]^+$ представляют собой появляющиеся при ионизации комбинации сахаров, входящих в состав гликозида. Потеря фрагмента с m/z 176 соответствует либо глюкуроновой кислоте, либо ацильной группе, представленной феруловой кислотой. Поэтому данное соединение может являться гликозидом кверцетина, четырех гексоз и одной молекулы феруловой или глюкуроновой кислоты.

На рис. 4 представлена УФ-хроматограмма ($\lambda = 270$ нм) основных флавоноидных гликозидов для экстракта листьев *N. orientalis*. Анализ масс-спектров пиков в режиме генерации отрицательных и положительных ионов на хроматограммах общего ионного тока позволил определить молекулярные массы и фрагменты основных соединений (табл. 3, 5).

Вещества с временами удерживания 15.2, 16.1 и 16.5 мин имели мол. м. 788 Д и фрагментацию аналогичную для соединений с такой же массой, обнаруженных в *N. sativa* и *N. damascene*. Предположительно эти соединения — гликозиды кверцетина и трех молекул гексоз. Вещества с одинаковой мол. м. 626 Д и временами удерживания 18.4 и 18.9 мин являются гликозидами кверцетина и двух гексоз с масс-спектрами аналогичными для такого же вещества в *N. damascene*.

Таблица 5. Флавоноидные гликозиды в экстракте листьев *Nigella orientalis* L.

RT, мин	Предполагаемая структура вещества	мол. м., Д	Содержание, г/100 г сухого веса
15.2	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.27 ± 0.005
16.1	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.19 ± 0.001
16.5	Гликозид кверцетина и 3 гексоз	788	0.31 ± 0.01
17.3	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и малоновой кислоты	874	0.04 ± 0.003
17.7	Гликозид кверцетина, 3 гексоз и малоновой кислоты	874	0.09 ± 0.002
18.4	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	0.15 ± 0.005
18.9	Гликозид кверцетина и 2 гексоз	626	0.12 ± 0.003
19.7	Гликозид кверцетина	712	0.08 ± 0.007
20.2	Гликозид кверцетина	712	0.07 ± 0.002
20.6	Гликозид кемпферола и 2 гексоз	610	0.02 ± 0.001
	Сумма		1.07

Примечание. Приведены средние значения для 3 биологических повторностей при уровне значимости $P \leq 0.05$.

В пиках с временами удерживания 17.3 и 17.7 мин присутствовали вещества с одинаковой мол. м. 874 Д, что подтверждается обнаруженными ионами с m/z 873 = $[M-H]^-$ (режим отрицательной ионизации) и m/z 875 = $[M+H]^+$ (режим положительных ионов). Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 713 = $[M+H-162]^+$, m/z 551 = $[M+H-162-162]^+$; m/z 465 = $[M+H-162-162-86]^+$; m/z 303 = $[M+H-162-162-162-86]^+$. Агликон (m/z 303) соответствует кверцетину. Потеря фрагмента с m/z 86 соответствует ацильной группе, представленной малоновой кислотой [19]. Таким образом, это соединение представляет собой гликозид кверцетина, трех гексоз и молекулы малоновой кислоты. Соединения с одинаковой мол. м. 712 Д имели времена удерживания 19.7 и 20.2 мин. В режиме положительной ионизации зарегистрированы ионы с m/z 713 = $[M+H]^+$, m/z 735 = $[M+Na]^+$, m/z 751 = $[M+K]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал ион агликона кверцетина: m/z 303 = $[M+H-сахара]^+$. Это соединение представляет собой гликозид кверцетина.

В масс-спектре вещества с мол. м. 610 Д и временем удерживания 20.6 мин в режиме отрицательной ионизации присутствовали ионы с m/z 609 = $[M-H]^-$, в режиме положительной ионизации — m/z 633 = $[M+Na]^+$, m/z 611 = $[M+H]^+$. Масс-спектр дочерних ионов в положительной ионизации содержал следующие ионы: m/z 449 = $[M+H-162]^+$; m/z 287 = $[M+H-162-162]^+$ (рис. 2г). Агликон с m/z 287 соответствует кемпферу. Соединение является гликозидом кемпферола и двух гексоз.

Суммарное количество флавоноидных гликозидов в экстрактах листьев *N. sativa* был в 4 раза выше, чем в экстрактах двух других видов чернушки (табл. 2, 4, 5). При этом следует отметить, что в листьях всех исследованных видов чернушки преобладали гликозиды кверцетина, что также подтверждается суммарным содержанием агликона кверцетина в гидролизованных экстрактах. Несмотря на то, что содержание кемпферола в образцах после гидролиза всего в 1.40–1.97 раза меньше (табл. 1), чем кверцетина, нам удалось обнаружить на хроматограммах лишь два его гликозида. Учитывая наблюдаемое разнообразие состава гликозидов кверцетина, можно предположить, что растения рода чернушка также способны синтезировать и накапливать различные по составу и строению производные кемпферола. По-видимому, из-за возможного разнообразия соединений кемпферола, его более низкого содержания и анализа грубого экстракта без предварительных фракционирования, очистки и концентрирования, мы не смогли идентифицировать на хроматограммах и в масс-спектрах все гликозиды кемпферола.

Таким образом, установлено что листья *N. sativa* в условиях Центральной Беларуси имеют наиболее богатый состав флавоноидных гликозидов по отношению к другим изучаемым видам. По качественному составу флавоноидных гликозидов вид *N. damascene* наиболее близок к *N. sativa*, тогда как по общему содержанию этой группы соединений — к *N. orientalis*. Стоит упомянуть, что виды *N. sativa* и *N. damascene* имеют наибольшее фенотипическое сходство и более устойчивы к условиям произрастания в Беларуси (на основании 9-летних полевых экспериментов на территории Цен-

трального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси). Отмечено, что вид *N. orientalis* отличается внешне и более требователен к условиям культивирования. Полевые испытания изучаемых видов чернушки показали, что *N. sativa* и *N. damascene* стабильно дают жизнеспособные семена, всхожесть которых колеблется в пределах 60–80%, в то время как семена *N. orientalis* имели всхожесть 20–45% и были отмечены 2 года, когда семена не успели вызреть. Также следует отметить различия в габитусе растений: виды *N. sativa* и *N. damascene* отличаются большей высотой и кустистостью с количеством побегов первого порядка 5–9 шт., тогда как вид *N. orientalis* формировал 2–3 побега первого порядка. Было установлено, что в листьях *N. orientalis* разнообразие флавоноидных гликозидов меньше, при отсутствии высокомолекулярных и ацилированных форм. Известно [20], что гликозилирование и ацилирование позволяет улучшать растворимость, химическую стабильность флавоноидов, их участие в активном мембранном транспорте и защите от УФ-излучения, повышая способность к его поглощению и нейтрализации АФК. Возможно отсутствие ацилированных производных и меньшее разнообразие флавоноидных гликозидов сказывается на низкой устойчивости *N. orientalis* к абиотическим факторам и снижает его адаптационный потенциал. Опираясь на данные по мультилокусному ДНК-маркированию 3 видов рода *Nigella* [21] можно предположить генетическую обусловленность состава флавоноидных гликозидов у видов этого рода. Так, вид *N. orientalis* занимает отдельный кластер на дендрограмме, отражающей степень генетического сходства (на основе 235 маркеров (RAPD и ISSR)), в то время как виды *N. sativa* и *N. damascene* относятся к одному кластеру.

Работа выполнена при финансовой поддержке задания 06.02 Государственной программы научных исследований “Природные ресурсы и окружающая среда”, подпрограмма “Биоразнообразие, биоресурсы, экология” (2021–2025).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович и С.Н. Шиш выдвинули и разработали схему эксперимента. Образцы для анализа были подготовлены С.Н. Шиш. Авторы П.С. Шабуня и С.А. Фатыхова провели ВЭЖХ-МС экстрактов на содержание флавоноидных гликозидов, а также расчеты содержания веществ с описанием их идентификации. Авторы С.Н. Шиш, П.С. Шабуня и Е.В. Спиридович участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении и изложении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дудченко Л.Г., Козьяков А.С., Кривенко В.В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. Справочник. Киев: Наукова думка. 1989. 304 с.
2. Прохоров В.Н. Нигелла — ценная хозяйственно-полезная культура (обзор литературы) // Овощи России. 2021. P. 111.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-111-123>
3. Datta A.K., Saha A. Cytomorphological studies and seed protein characterization of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. // Cytologia (Tokyo). 2003. V. 68. P. 51.
4. Benazzouz-Smail L., Achat S., Brahmi F., Bachir-Bey M., Arab R., Lorenzo J.M., Benbouriche A., Boudiab K., Hauchard D., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K. Biological properties, phenolic profile, and botanical aspect of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. seeds // Molecules. 2023. V. 28. P. 571.
<https://doi.org/10.3390/molecules28020571>
5. Bourgou S., Riadh K., Amor B., Ines S., Hanen F., Brahim M. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots // C. R. Biol. 2008. V. 331. P. 48.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.11.001>
6. Исакова А.Л., Прохоров В.Н., Исаков А.В. Нигелла в Беларуси. Горки: БГСХА, 2021. 118 с.
7. Kokoska L., Havlik J., Valterova I., Nepovim A., Rada V., Vanek T. Chemical composition of the essential oil of *Nigella orientalis* L. seeds // Flavour Fragr. J. 2005. V. 20. P. 419.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1449>
8. Kökdil G., Tamer L., Ercan B., Celik M., Atik U. Effects of *Nigella orientalis* and *N. segetalis* fixed oils on blood biochemistry in rats // Phytother. Res. 2006. V. 20. P. 71.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1809>
9. Ait Eldjoudi D., Ruiz-Fernandez C., González-Rodríguez M., Ait Atmane S., Cordero-Barreal A., Farrag Y., Pino J., Sineiro J., Lago F., Conde-Aranda J., Khettal B., Gualillo O. Analgesic and antiinflammatory effects of *Nigella orientalis* L. seeds fixed oil: pharmacological potentials and molecular mechanisms // Phytother. Res. 2022. V. 36. P. 1372.
<https://doi.org/10.1002/ptr.7400>
10. Gueffa A., Gonzalez-Serrano D.J., Christodoulou M.C., Orellana-Palacios J.C., Lopez S., Ortega M., Ould-moumna A., Zohra Kiari F., Ioannou G.D., Kapnissi-Christodoulou C.P., Moreno A., Hadidi M. Phenolics from defatted black cumin seeds (*Nigella sativa* L.): ultrasound-assisted extraction optimization, comparison, and antioxidant activity // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 1311.
<https://doi.org/10.3390/biom12091311>
11. Topcagic A., Zeljkovic S.C., Karalija E., Galijasevic S., Sofic E. Evaluation of phenolic profile, enzyme inhibitory and antimicrobial activities of *Nigella sativa* L. seed extracts // Bosn. J. Basic Med. Sci. 2017. V. 17. P. 286.
<https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.2049>
12. Akram Khan M., Afzal M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: part 2 recent advances // Inflammopharmacology. 2016. V. 24. P. 67.
<https://doi.org/10.1007/s10787-016-0262-7>

13. Hameeda S., Imrana A., un Nisaa M., Arshada M.S., Saeeda F., Umair Arshada M., Khan M.A. Characterization of extracted phenolics from black cumin (*Nigella sativa* linn), coriander seed (*Coriandrum sativum* L.), and fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) // Int. J. Food Prop. 2019. V. 22. P. 714.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1599390>
14. Шииш С.Н., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А. Растения рода *Nigella* как источник ценных биологических веществ для биотехнологии // Материалы Международной научной конференции “Настоящее и будущее биотехнологии растений”, г. Минск, 2023. С. 98.
15. Ansary J., Regolo L., Machi M., Salinari A. Cianciosi D. Evaluation of the *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds of black cumin (BARI-1 cumin) methanolic extract // eFood. 2022. V. 3:e15.
<https://doi.org/10.1002/efd2.15>
16. Parveen A., Farooq M.A., Kyunn W.W. A new oleanane type saponin from the aerial parts of *Nigella sativa* with anti-oxidant and anti-diabetic potential // Molecules. 2020. V. 25. P. 2171.
<https://doi.org/10.3390/molecules25092171>
17. Dalli M., Bekkouch O., Azizi S., Azghar A., Gseyra N., Kim B. *Nigella sativa* L. phytochemistry and pharmacological activities: a review (2019–2021) // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 20.
<https://doi.org/10.3390/biom12010020>
18. Liu Y.M., Liu Q.H., Chen B.Q. A new flavonol glycoside from the seeds of *Nigella glandulifera* // Nat. Prod. Res. 2011. V. 25. P. 1334.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2010.534470>
19. Pinheiro P.F., Justino G.C. Structural analysis of flavonoids and related compounds – a review of spectroscopic applications // Phytochemicals – a global perspective of their role in nutrition and health / Ed. V. Rao. InTech. 2012. P. 33.
<https://doi.org/10.5772/29152>
20. Alseekh S., Perez de Souza L., Benina M., Fernie A.R. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function // Phytochem. 2020. V. 174. P. 112347.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112347>
21. Юхимук А.Н., Тхань Л.Н., Спиридович Е.В. Молекулярно-генетический анализ некоторых видов рода чернушка (*Nigella* L.) // Сборник материалов II международной научно–практической конференции “Биотехнология: достижения и перспективы развития”. Пинск. 2017. С. 53.

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ АНОМАЛЬНЫХ СВЕТО-ТЕМНОВЫХ ЦИКЛОВ НА ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВ Brassicaceae И Solanaceae

© 2023 г. Т. Г. Шибаета^а, *, Е. Г. Шерудило^а, А. А. Рубаева^а, И. А. Лёвкин^б, А. Ф. Титов^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра
Российской академии наук, Петрозаводск, Россия

^бПетрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

*e-mail: shibaeva@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

В условиях контролируемой среды изучали влияние длинных свето-темновых циклов 24/12, 48/24, 96/48, 120/60 ч и непрерывного освещения на содержание и соотношение фотосинтетических и нефотосинтетических пигментов у ряда растений семейства Solanaceae — баклажана (*Solanum melongena* L.), перца (*Capsicum annuum* L.), табака (*Nicotiana tabacum* L.), томата (*Solanum lycopersicum* L.) и семейства Brassicaceae — брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), мизуны (*Brassica rapa* ssp. *nipposinica* (L.H. Bailey) Hanelt), руколы (*Eruca vesicaria* ssp. *sativa* (Mill.) Thell.) и цветной капусты (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). Растения выращивали в климатических камерах при температуре 23°C и освещенности 270 мкмоль/(м² с) ФАР. Контролем служили растения, выращенные при фотопериоде 16/8 ч. Установлено, что в условиях непрерывного освещения у растений в зависимости от вида в той или иной степени снижается содержание хлорофилла и его доля в светособирающем комплексе, увеличивается отношение хлорофилл *a/b* и уменьшается отношение хлорофилл/каротиноиды, повышается содержание антоцианов и флавоноидов. При всех других изученных свето-темновых циклах (24/12, 48/24, 96/48 и 120/60 ч), в которых средний интеграл дневного освещения не отличался от такового при обычном фотопериоде (16/8 ч), во многих случаях были отмечены изменения в пигментном комплексе, схожие с фотопротекторными реакциями, наблюдаемыми при избыточном освещении растений (снижение содержания фотосинтетических пигментов, изменение их соотношений и накопление защитных нефотосинтетических пигментов). При этом в реакции растений выявлена выраженная видовая специфичность. В целом результаты исследования показали, что изменения в пигментном комплексе растений могут быть обусловлены не только избыточностью поступающей световой энергии, но и распределением интеграла освещения во времени, как это происходит в ответ на аномальные свето-темновые циклы, которые, по мнению авторов, вызывают циркадную асинхронию.

Ключевые слова: аномальные свето-темновые циклы, фотопротекция, хлорофилл, каротиноиды, антоцианы, флавоноиды, Brassicaceae, Solanaceae

DOI: 10.31857/S0015330323600882, **EDN:** ZQRAWD

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных новаций последних десятилетий в сельском хозяйстве являются “фабрики растений” с искусственным освещением. Они представляют собой закрытые производственные системы, в которых интегрированы современные промышленные технологии для круглогодичного производства продукции различных сельскохозяйственных культур [1, 2]. Чтобы быть по-настоящему успешными “фабрики растений” должны производить продукты с высокой рыночной стоимостью, что может быть достигнуто с помощью

контроля и управления факторами среды, которые гарантируют получение стабильно высококачественных продуктов. Качество растительной продукции включает многие аспекты, которые, в свою очередь, зависят от конкретных показателей и свойств, например, таких как содержание воды и минералов, текстура ткани, содержание фитохимических веществ и пр. Фитохимические вещества влияют на вкус и аромат, внешний вид, срок годности, пищевую и фармацевтическую ценность [3]. Задача заключается в том, чтобы конвертировать эти знания в технологии выращивания растений с заданными характеристиками. При возможности контролировать и управ-

Сокращения: ИДО — интеграл дневного освещения.

лять основными факторами внешней среды, наиболее важными и перспективными в плане повышения энергоэффективности производства и улучшения качества растительной продукции считаются манипуляции со световым фактором, т.к. с ним связаны основные затраты на энергопотребление [4]. При этом исходят из общепринятых представлений о существовании у светового фактора трех составляющих, каждый из которых оказывает существенное влияние на жизнедеятельность растений — интенсивность света, фотопериод (продолжительность светового периода в суточном цикле) и качество света (спектральный состав). Так, например, для улучшения пищевой ценности (например, большего содержания клетчатки и антиоксидантов) рекомендуют применение повышенной интенсивности света, что увеличивает интенсивность фотосинтеза и в то же время вызывает легкую стрессовую реакцию с усиленной выработкой каротиноидов, витамина С и фенольных соединений (например, флавоноидов) [3]. Хотя иногда излишне высокая освещенность вызывает горечь, например, из-за высоких концентраций антоцианов и хлорофилла. Эти эффекты зависят от культуры, влажности, температуры и других факторов. Спектральный состав света также может оказывать сильное влияние на качество продукции вследствие его значительного воздействия на биохимический состав растений. Однако на “фабриках растений” имеется возможность не только регулировать любой из указанных трех световых параметров, но и изменять распределение интеграла дневного освещения (суммарного количества фотонов, получаемых растением за сутки) во времени, что по сути позволяет говорить о существовании еще одного, четвертого параметра светового фактора, который также может оказывать значительное влияние на растения [5]. Принимая во внимание, что в закрытых системах нет необходимости учитывать 24-часовую продолжительность суток, вполне допустимо расширить понятие “распределение интеграла света” во времени, выйдя за пределы 24 ч, т.е. применять в экспериментах и на практике аномальные (*abnormal*) свето-темновые циклы (при этом они могут быть как короче, так и длиннее 24 ч) [6, 7]. Важно, что аномальные свето-темновые циклы, включая круглосуточное освещение (как частный случай), способны оказывать на растения положительный эффект (ускорять рост и развитие, увеличивать накопление ценных и снижать содержание нежелательных метаболитов, например, нитратов) и при этом приводить к уменьшению энергозатрат на единицу продукции [5, 8, 9]. Во многих случаях они вызывают определенные изменения в фотосинтетическом аппарате растений, в частности, в составе пигментного комплекса.

Цель работы — изучение влияния длинных свето-темновых циклов 16/8, 24/12, 48/24, 96/48, 120/60 ч и круглосуточного освещения на содержание и соотношение фотосинтетических и нефотосинтетических пигментов у растений двух семейств — пасленовых и крестоцветных, а именно баклажана, перца, табака, томата, брокколи, мизуны, руколы и цветной капусты, которые широко используются в сельскохозяйственной практике и имеют большое экономическое значение во многих странах мира, включая Россию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служил ряд видов растений семейства Solanaceae — баклажан (*Solanum melongena* L.), перец (*Capsicum annuum* L.), табак (*Nicotiana tabacum* L.) томат (*Solanum lycopersicum* L.) и семейства Brassicaceae — брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), мизуна (*Brassica rapa* ssp. *nipposinica* (L.H. Bailey) Hanelt), рукола (*Eruca vesicaria* ssp. *sativa* (Mill.) Thell.) и цветная капуста (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). Растения выращивали в камерах искусственного климата при температуре 23°C, освещении светодиодами лампами GL V300 (“LED Grow Light”, КНР) с 270 мкмоль/(м² с) фотосинтетически активной радиации (ФАР), фотопериоде 16/8 ч при ежедневном поливе полным питательным раствором Хогланда-Арнона (pH 6.2–6.4). Брокколи, мизуну и руколу выращивали в виде микрозелени на кокосовых ковриках при поливе 50% питательным раствором. Пасленовые культуры и цветную капусту в фазе 2–3 настоящих листьев, а брокколи, мизуну и руколу, начиная с четвертых суток после проращивания семян в темноте в течение 15 или 8 сут, соответственно, подвергали воздействию аномальных циклов день/ночь 24/12, 48/24, 96/48 и 120/60 ч. Кроме того, часть растений освещали постоянно и с учетом длительности опыта эти варианты обозначены как 360/0 ч для 15-дневных опытов и 192/0 ч для 8-дневных опытов с микрозеленью. В качестве контрольных использовали растения, находящиеся в течение всего опыта в условиях фотопериода 16/8 ч. В контрольном варианте (16/8 ч) и во всех вариантах свето-темновых циклов (24/12, 48/24, 96/48 и 120/60 ч) средний интеграл дневного освещения (ИДО) составлял 15.6 моль/(м² сут), а при постоянном освещении 23.3 моль/(м² сут).

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и *b*, каротиноидов) определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (“ОКБ Спектр”, Россия), экстрагируя их 96% этиловым спиртом и рассчитывая по известным формулам [10]. Долю хлорофиллов светособирающего комплекса (ССК) устанавливали исходя из того, что весь хлорофилл *b* находится в ССК, а соотношение хлорофиллов *a/b* при этом составляет 1.2 [11].

Для определения содержания антоцианов и флавоноидов навески растительного материала гомогенизировали в холодной смеси этанола и 1.5Н соляной кислоты с последующей 14-часовой экстракцией в холодильнике в темноте. После 5 мин центрифугирования экстракта при 10000 g и температуре +4°C определяли оптическую плотность при 300, 350, 530 и 657 нм на спектрофотометре СФ 2000 ("ОКБ Спектр", Россия). При расчете содержания антоцианов учитывали величину поглощения хлорофилла и продуктов его распада при 657 нм. Содержание антоцианов выражали в условных единицах как величины $(A_{530} - 0.25A_{657})/\text{г сырой массы}$, а флавоноидов $UB - (A_{300}/\text{г сырой массы})$, $UA - (A_{350}/\text{г сырой массы})$ [12].

Для определения содержания перекиси водорода навеску растительной ткани гомогенизировали на льду в 0.1% ТХУ, центрифугировали 15 мин при 12000 g и температуре 4°C. К 0.5 мл супернатанта добавляли по 0.5 мл 10 мМ К-фосфатного буфера (рН 7.0) и 1 мл 1 М KI. После 1 ч выдерживания смеси в холодильнике в темноте определяли оптическую плотность при 390 нм на спектрофотометре СФ 2000 ("ОКБ Спектр", Россия) [13]. Содержание перекиси водорода рассчитывали по стандартной концентрационной кривой и выражали в мкмоль/г сырого веса.

Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли методом, основанным на реакции образования триметинового комплекса с максимумом поглощения 532 нм при взаимодействии этих соединений с тиобарбитуровой кислотой [14].

В работе представлены средние значения из пяти и более повторностей и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями определяли на основе дисперсионного анализа (LSD тест). Достоверными считали различия при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты показывают, что в условиях постоянного освещения (360/0 и 192/0 ч) у всех исследованных видов растений, за исключением руколы, происходит значительное снижение содержания хлорофиллов (рис. 1а). У таких чувствительных к круглосуточному освещению пасленовых растений, как баклажан, томат и табак, содержание хлорофилла снижалось на 40–80%. У более устойчивого перца и крестоцветных брокколи и мизуны снижение достигало 24%, а у руколы отмечалось увеличение содержания хлорофилла на 18% по сравнению с контрольными растениями. Соотношение хлорофиллов а/б увеличивалось или менялось незначительно, но с

тенденцией к увеличению (рис. 1б), а доля хлорофилла в ССК имела тенденцию к снижению (рис. 1в). Содержание каротиноидов у всех видов, за исключением брокколи и цветной капусты, значительно снижалось (рис. 1г). Соотношение хлорофиллы/каротиноиды у большинства видов, за исключением мизуны и руколы, снижалось или имело тенденцию к снижению (рис. 1д). Содержание нефотосинтетических пигментов (антоцианов и флавоноидов) увеличивалось под действием постоянного освещения практически у всех видов растений (рис. 2а, 2б). У всех растений в той или иной степени наблюдалось увеличение содержания перекиси водорода (рис. 3а) и МДА (рис. 3б).

В условиях аномальных свето-темновых циклов с ИДО равным таковому в контрольном варианте у всех растений, за исключением мизуны, отмечено снижение содержания хлорофилла и увеличение содержания антоцианов и флавоноидов (табл. 1, 2). В отношении содержания каротиноидов наблюдались разные реакции: снижение у баклажанов, перца, брокколи и руколы; отсутствие изменений или небольшое увеличение у табака, томата и цветной капусты; и увеличение у мизуны. При этом соотношение хлорофиллы/каротиноиды снижалось. Также у всех видов отмечено увеличение содержания перекиси водорода под влиянием аномальных свето-темновых циклов (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В многочисленных исследованиях, направленных на повышение эффективности фабрик растений, доминируют работы, связанные с манипулированием световым фактором и поиском наиболее оптимальных световых режимов (через подбор интенсивности ФАР и спектрального состава света) для выращивания конкретных культур. Однако при этом крайне мало работ, направленных на изучение влияния на растения распределения ИДО во времени. Между тем, учитывая большую вариативность данного показателя, нетрудно предположить, что манипулирование с ИДО может открыть новые возможности для решения ключевых задач — снижения затрат на единицу продукции и повышения пищевой ценности растений. Данная постановка вопроса определяла содержание первого этапа наших исследований по выявлению свето-темновых циклов, способных оказывать положительный эффект как на фотосинтетический аппарат растений, успешная работа которого в значительной степени определяет продуктивность растений, так и на содержание вторичных метаболитов, которые во многом обеспечивают пищевую ценность растениеводческих продуктов. Неслучайно одной из главных задач производителей является

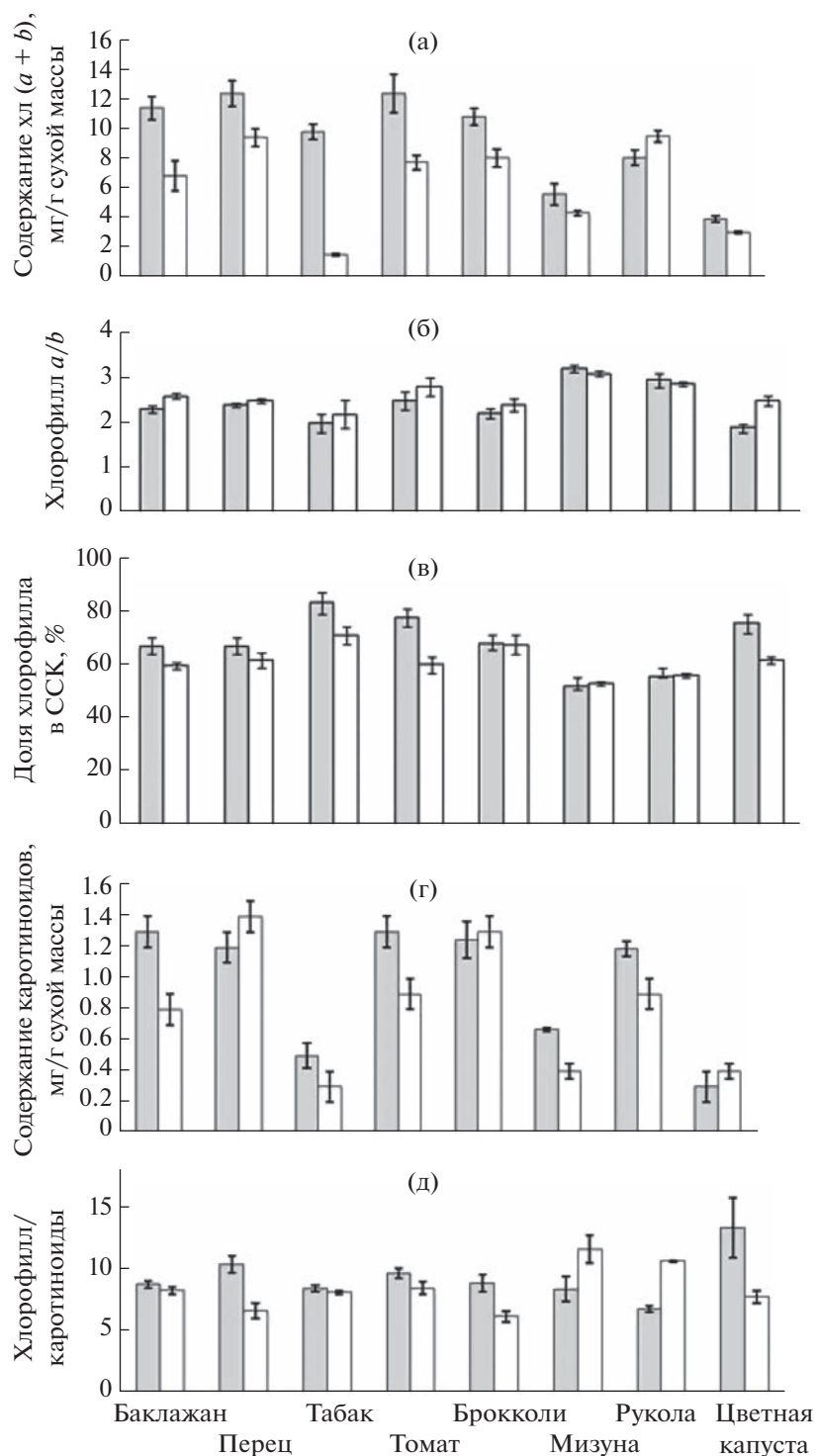


Рис. 1. Содержание хлорофилла (а), отношение хлорофилл a/b (б), доля хлорофилла в ССК (в), содержание каротиноидов (г) и отношение хлорофилл/каротиноиды в листьях растений в условиях фотопериода 16/8 ч (1) и при постоянном освещении (2).

получение продукции, которую можно использовать в качестве функционального продукта (“functional food”) для здорового питания. Поэтому увеличение в растениях содержания веществ, обладающих антиоксидантной активностью, повышает

их ценность и делает продукт более полезным и конкурентноспособным. Как следует из полученных нами результатов, непрерывное освещение с более высоким по сравнению с обычным 16-часовым фотопериодом ИДО вызывает в растениях

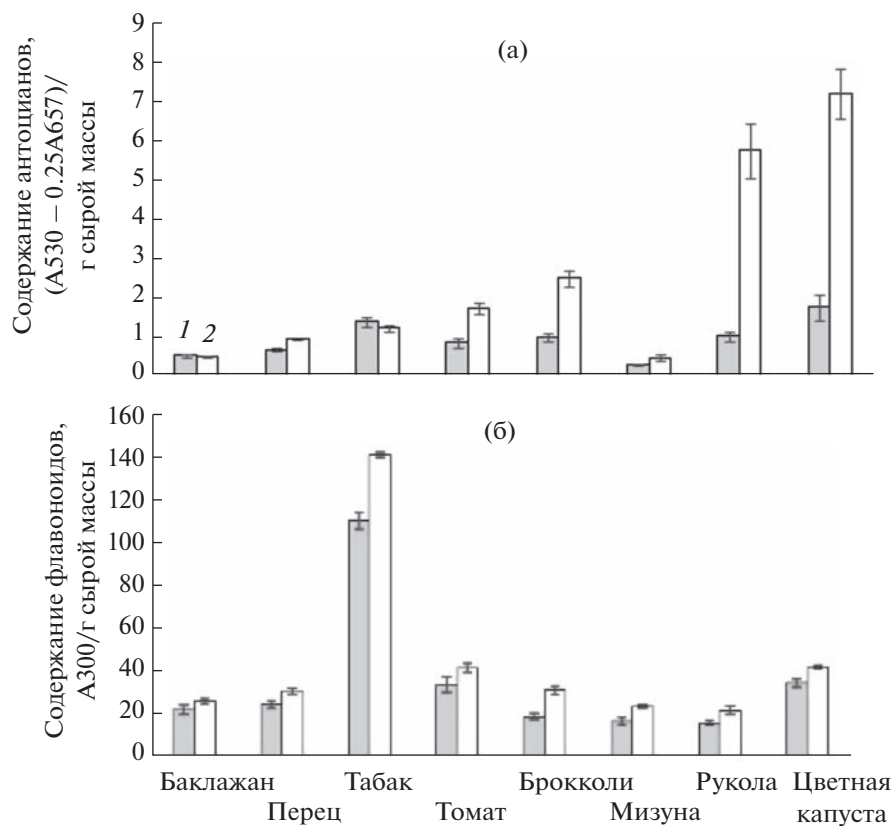


Рис. 2. Содержание антоцианов (а) и флавоноидов (б) в листьях растений в условиях фотопериода 16/8 (1) и при постоянном освещении (2).

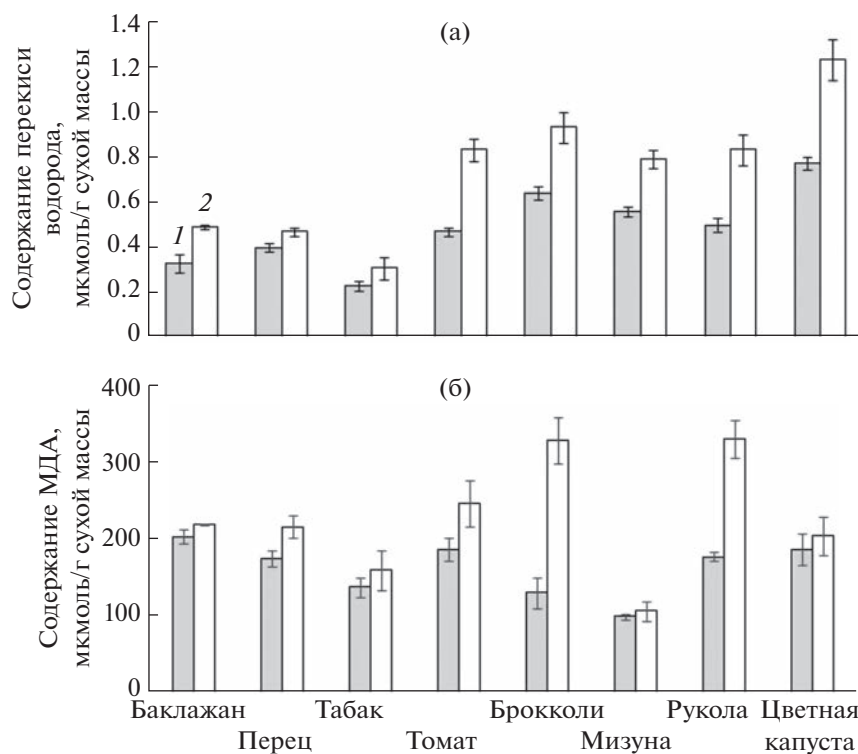


Рис. 3. Содержание перекиси водорода (а) и МДА (б) в листьях растений в условиях фотопериода 16/8 (1) и при постоянном освещении (2).

Таблица 1. Влияние свето-темновых циклов на содержание фотосинтетических и нефотосинтетических пигментов растений семейства Solanaceae

Свето-темновой цикл, ч	Хлорофилл, мг/г сухой массы	Каротиноиды, мг/г сухой массы	Хлорофилл/каротиноиды	Антоцианы, $(A_{530} - 0.25A_{657})$ /г сырой массы	Флавоноиды, A_{300} /г сырой массы
Баклажан					
16/8	17.1 ± 1.8 a	2.1 ± 0.3 a	8.1 ± 0.2 a	0.54 ± 0.04 b	22.2 ± 2.1 d
24/12	14.7 ± 0.3 b	1.8 ± 0.3 ab	8.1 ± 0.2 a	0.58 ± 0.11 a	22.4 ± 0.3 d
48/24	14.0 ± 2.8 b	1.8 ± 0.1 ab	7.6 ± 0.3 b	0.53 ± 0.05 b	37.1 ± 3.5 ab
96/48	12.3 ± 2.1 bc	1.8 ± 0.4 ab	7.6 ± 0.1 b	0.55 ± 0.04 b	40.6 ± 2.7 a
120/60	12.0 ± 0.9 c	1.6 ± 0.3 b	7.1 ± 0.1 c	0.51 ± 0.03 b	33.5 ± 2.9 b
Перец					
16/8	19.9 ± 1.0 a	2.5 ± 0.2 a	8.1 ± 0.5 a	0.69 ± 0.04 b	24.6 ± 1.6 b
24/12	14.5 ± 1.2 b	1.9 ± 0.1 b	7.7 ± 0.2 ab	0.60 ± 0.08 b	29.0 ± 3.8 b
48/24	12.9 ± 0.8 bc	1.6 ± 0.1 c	7.9 ± 0.4 a	0.66 ± 0.05 a	36.6 ± 2.9 a
96/48	10.9 ± 3.3 c	1.5 ± 0.5 c	7.2 ± 0.1 b	0.52 ± 0.06 c	34.0 ± 2.9 a
120/60	12.7 ± 1.7 bc	1.6 ± 0.1 c	8.0 ± 0.3 a	0.61 ± 0.06 b	37.7 ± 3.6 a
Табак					
16/8	9.9 ± 0.3 a	0.6 ± 0.15 c	8.5 ± 0.25 a	1.39 ± 0.14 a	106.5 ± 0.8 a
24/12	7.5 ± 0.6 b	0.7 ± 0.16 c	8.5 ± 0.21 a	1.00 ± 0.08 b	93.5 ± 7.4 a
48/24	4.5 ± 0.6 c	0.5 ± 0.26 c	8.8 ± 0.61 a	0.95 ± 0.21 b	97.3 ± 9.5 a
96/48	6.0 ± 1.1 bc	1.1 ± 0.1 b	7.1 ± 0.19 b	1.07 ± 0.18 b	87.7 ± 4.0 b
120/60	6.5 ± 0.3 b	1.5 ± 0.15 a	8.2 ± 0.15 a	0.90 ± 0.12 b	78.4 ± 9.9 c
Томат					
16/8	19.6 ± 0.3 a	1.4 ± 0.1 a	8.3 ± 0.5 b	0.86 ± 0.13 c	33.9 ± 3.9 b
24/12	16.2 ± 1.2 b	1.3 ± 0.1 a	8.8 ± 1.1 a	0.87 ± 0.02 c	34.9 ± 1.3 b
48/24	10.3 ± 1.9 c	1.5 ± 0.1 a	8.8 ± 0.8 a	1.18 ± 0.07 b	34.9 ± 2.0 b
96/48	13.9 ± 2.0 bc	1.4 ± 0.1 a	9.5 ± 1.0 a	2.12 ± 0.30 a	41.8 ± 3.8 a
120/60	18.2 ± 5.7 a	1.4 ± 0.1 a	6.7 ± 0.2 c	2.15 ± 0.30 a	36.7 ± 3.4 b

Примечание. Различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при $P < 0.05$.

определенные фотопротекторные реакции. В зависимости от чувствительности у растений разных видов в той или иной степени уменьшается содержание хлорофилла, приводящее к снижению поглощения света на единицу площади листа, что служит одним из механизмов защиты от избыточного освещения. Ранее нами было показано, что если непрерывное освещение сочетается с более низкой интенсивностью света, то есть не приводит к увеличению количества полученных растениями фотонов света, то реакция устойчивых растений, например, брокколи и мизуны, может быть иной и количество хлорофилла может даже увеличиваться [15]. У чувствительных к круглосуточному освещению пасленовых растений более высокий ИДО не является в этом случае причиной развития фотоповреждений, а уменьшение содержания хлорофилла происходит даже если ИДО не выше, чем обычно требуется растениям при более коротких фотопериодах [16]. В условиях

постоянного освещения практически у всех изученных видов наблюдалось увеличение соотношения хлорофиллов a/b в результате образования в ФСII ССК меньшего размера, а также уменьшение доли хлорофилла в ССК. В отношении каротиноидов известно, что, помимо светособирающей, фотохимической и структурной функций, они выполняют фотопротекторную функцию, защищая хлорофилл и другие компоненты фотосистем от светового “перевозбуждения” [17]. Полифункциональность каротиноидов связана с особенностями их строения. Каротиноиды входят в группу терпеноидов, фотозащитная функция которых обусловлена способностью дезактивировать активные формы кислорода. Многочисленные работы показывают, что повышенное содержание каротиноидов характерно для условий с высоким уровнем инсоляции [18]. Однако при постоянном освещении увеличение содержания каротиноидов происходит не всегда, а часто оно даже не-

Таблица 2. Влияние свето-темновых циклов на содержание фотосинтетических и нефотосинтетических пигментов растений семейства Brassicaceae

Свето-темновой цикл, ч	Хлорофилл, мг/г сухой массы	Каротиноиды, мг/г сухой массы	Хлорофилл/каротиноиды	Антоцианы, $(A_{530} - 0.25A_{657})/г$ сырой массы	Флавоноиды, $A_{300}/г$ сырой массы
Брокколи					
16/8	10.9 ± 0.6 a	1.25 ± 0.12 a	8.90 ± 0.71 a	1.00 ± 0.09 a	18.8 ± 1.6 b
24/12	6.5 ± 1.3 b	0.99 ± 0.17 ab	6.69 ± 0.40 b	1.07 ± 0.07 a	22.2 ± 1.7 a
48/24	7.0 ± 0.4 b	0.95 ± 0.02 b	7.36 ± 0.31 b	1.16 ± 0.15 a	17.5 ± 1.5 b
Мизуна					
16/8	5.7 ± 0.7 a	0.67 ± 0.01 c	8.43 ± 0.97 a	0.31 ± 0.03 c	16.7 ± 1.6 b
24/12	6.2 ± 0.2 a	0.94 ± 0.02 a	6.61 ± 0.27 b	0.56 ± 0.11 b	21.6 ± 2.8 a
48/24	6.0 ± 0.4 a	0.74 ± 0.06 b	8.33 ± 1.08 a	0.61 ± 0.06 a	19.9 ± 3.4 a
Рукола					
16/8	8.1 ± 0.5 a	1.19 ± 0.05 a	6.79 ± 0.25 a	1.02 ± 0.11 b	16.1 ± 0.9 a
24/12	6.3 ± 0.4 b	0.95 ± 0.06 b	6.80 ± 0.46 a	1.28 ± 0.19 a	15.6 ± 0.7 a
48/24	5.6 ± 0.3 c	0.90 ± 0.08 b	6.59 ± 0.56 a	0.92 ± 0.10 b	15.5 ± 0.7 a
Цветная капуста					
16/8	4.0 ± 0.2 a	0.3 ± 0.1 b	13.3 ± 2.4 a	1.77 ± 0.33 c	34.9 ± 1.9 d
24/12	4.7 ± 0.5 a	0.6 ± 0.1 a	8.2 ± 0.5 b	3.69 ± 0.58 b	67.8 ± 2.1 b
48/24	3.7 ± 0.7 b	0.5 ± 0.1 a	7.6 ± 0.4 b	4.50 ± 0.32 a	59.8 ± 5.7 c
96/48	3.0 ± 0.4 c	0.3 ± 0.1 b	9.3 ± 1.5 b	5.61 ± 0.65 a	76.7 ± 6.2 a
120/60	4.0 ± 0.6 a	0.5 ± 0.3 a	7.9 ± 0.4 b	5.36 ± 0.72 a	51.2 ± 5.2 c

Примечание. Различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при $P < 0.05$.

Таблица 3. Содержание перекиси водорода (мкмоль/г сырой массы) в листьях растений, выращенных в условиях разных свето-темновых циклов

Вид растения	Свето-темновые циклы, ч				
	16/8	24/12	48/24	96/48	120/60
Баклажан	0.33 ± 0.04 c	0.38 ± 0.03 bc	0.41 ± 0.06 ab	0.47 ± 0.02 a	0.40 ± 0.01 b
Перец	0.40 ± 0.02 c	0.42 ± 0.02 c	0.44 ± 0.02 c	0.61 ± 0.02 a	0.53 ± 0.06 b
Табак	0.23 ± 0.02 c	0.31 ± 0.05 b	0.32 ± 0.07 ab	0.26 ± 0.04 bc	0.36 ± 0.04 a
Томат	0.47 ± 0.02 c	0.62 ± 0.17 b	0.78 ± 0.11 a	0.69 ± 0.06 b	0.75 ± 0.07 a
Брокколи	0.64 ± 0.03 b	0.80 ± 0.07 a	0.63 ± 0.03 b	—	—
Мизуна	0.56 ± 0.02 c	0.79 ± 0.05 a	0.65 ± 0.06 b	—	—
Рукола	0.50 ± 0.03 a	0.46 ± 0.03 a	0.52 ± 0.03 a	—	—
Цветная капуста	0.77 ± 0.03 b	0.88 ± 0.13 a	0.95 ± 0.06 a	0.83 ± 0.08 a	0.86 ± 0.09 a

Примечание. Различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при $P < 0.05$; “—” — нет данных.

сколько снижается, что показано нами в данной работе и ранее [15, 16, 19]. Важно, что при этом практически всегда уменьшается соотношение хлорофиллы/каротиноиды, что указывает на относительно более высокую концентрацию каротиноидов в пуле фотосинтетических пигментов, и что способствует реализации их защитной функции в условиях избыточного освещения. Существенно также и то, что в условиях постоянного

освещения у всех изученных видов отмечено увеличение содержания антоцианов и флавоноидов. Флавоноиды — большая группа фенольных вторичных метаболитов, широко представленная в растительном мире. Благодаря своей способности поглощать ультрафиолетовое излучение (330–350 нм) и часть видимых лучей (520–560 нм), флавоноиды защищают растительные ткани от избыточной радиации. Антоцианы, один из

подклассов флавоноидов, участвуют в защите хлоропластов растений от повышенной интенсивности света видимой области, выступая в качестве своеобразного светового экрана, поглощающего избыточные фотоны и таким образом конкурируя с хлорофиллами за абсорбцию световой энергии [20–24]. Это позволяет причислить их к участникам нефотохимического защитного механизма наряду с пигментами ксантофиллового цикла [25]. Отмечено, например, что более эффективно, чем каротиноиды, фотопротекторную роль антоцианы выполняют при длительном действии световых стрессов, а каротиноиды ксантофиллового цикла, наоборот, при краткосрочных воздействиях [26]. Антоцианы также участвуют в защите от ультрафиолетового излучения (УФ-В) [27, 28], хотя некоторые исследователи отдают ведущую роль в защите от УФ бесцветным флавоноидам [26, 29]. Однако пока вопрос о том, какая функция является основной для флавоноидов и антоцианов — фотопротекторная или антиоксидантная — остается открытым [30–34]. Для человека важной особенностью антоцианов и флавоноидов является то, что они обладают широким спектром полезных для здоровья свойств, что делает “функциональные продукты” с их повышенным содержанием все более популярными [35, 36].

Учитывая известные данные о влиянии круглосуточного освещения на пигментный комплекс, реакция растений на постоянное освещение, которое также можно считать аномальным свето-темновым циклом, была ожидаема и может объясняться как увеличением ИДО, так и быть непосредственно результатом непрерывного поступления света, обуславливающего непрерывность поступления светового сигнала, протекания фотосинтеза и фотоокислительных процессов. Реакции же растений на другие аномальные свето-темновые циклы, которые обеспечивали растения таким же ИДО, как в контроле, были различны. В большинстве случаев растения демонстрировали признаки развития легкого окислительного стресса и, соответственно, изменения в пигментном комплексе, направленные на защиту от избыточного света, хотя суммарно за время опыта растения и не получали избытка фотонов света. Вероятно, фотозащитные реакции развивались в ответ на длительное (24, 48, 96 и 120 ч) действие света в первой части свето-темнового цикла. Кроме того, режимы свето-темновых циклов были такими, что растения могли освещаться во время скотофильной фазы и наоборот, во время фотофильной фазы могла быть темнота. По-видимому, такие режимы поступления света способны приводить к рассогласованию эндогенных (циркадных) биоритмов с внешним циклом свет/темнота, что также может вызывать неспецифические защитные реакции,

В целом наши данные показывают, что чувствительность растений к тем или иным световым воздействиям достаточно видоспецифична и особенно это проявляется в ответных реакциях с образованием защитных метаболитов, что подтверждается и литературными данными. Например, постоянное освещение микрорезели амаранта и листовой капусты приводило к увеличению у них содержания фенольных соединений и антоцианов, а также к усилению антиоксидантной активности, но в этих же условиях биохимический состав зеленого и фиолетового базилика не изменялся [37]. Поэтому для повышения эффективности, урожайности и качества растений, оценка их реакции на освещение и условия выращивания должна быть выполнена для каждого вида.

Наконец, из полученных нами результатов следует, что с помощью определенных аномальных свето-темновых циклов можно вызывать такие изменения в пигментном комплексе, которые будут сопровождаться повышением содержания определенных групп пигментов. При этом увеличение ИДО не является обязательным условием для запуска у растений фотозащитных реакций, приводящих к выработке определенных фитохимических веществ, которые могут являться ценными метаболитами, повышающими пищевую ценность растений. В рамках дальнейших исследований крайне важно будет установить физиолого-биохимические, а затем молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе реакции растений на аномальные свето-темновые циклы. Их установление должно стать надежной научной основой для достижения значительного прогресса в обеспечении в современных условиях продовольственной безопасности в целом и биологической безопасности продуктов питания в частности.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-16-00160) на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Despommier D.* The vertical farm: feeding the world in the 21st century. Thomas Dunne Books: New York, NY, USA, 2010.
2. *Kozai T., Nui G., Takagaki M.* Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015. 516 p.
3. *van Delden S.H., Sharathkumar M., Butturini M., Graamans L.J.A., Heuvelink E., Kacira M., Kaiser E.,*

- Klamer R.S., Klerkx L., Kootstra G., Loeber A., Schouten R.E., Stanghellini C., van Ieperen W., Verdonk J.C. et al.* Current status and future challenges in implementing and upscaling vertical farming systems // *Nature Food*. 2021. V. 2. P. 944. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00402-w>
4. *Kozai T., Niu G.* Role of the plant factory with artificial lighting (PFAL) in urban areas // *Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production* / Eds. T. Kozai et al. Academic Press: London, UK. 2020. P. 7.
 5. *Chen Xl., Li Yl., Wang Lc., Yang Qc., Guo Wz.* Responses of butter leaf lettuce to mixed red and blue light with extended light/dark cycle period // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. P. 6924. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10681-3>
 6. *Bowsher C.G., Long D.M., Oaks A., Rothstein S.J.* Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 281. <https://doi.org/10.1104/pp.95.1.281>
 7. *Chang A.C., Yang T.Y., Riskowskie G.L.* Ascorbic acid, nitrate, and nitrite concentration relationship to the 24 hour light/dark cycle for spinach grown in different condition // *Food Chem.* 2013. V. 138. P. 382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.036>
 8. *Kurata H., Achioku T., Furusaki S.* The light/dark cycle operation with an hour-scale period enhances caffeine production by *Coffea arabica*, cells // *Enzyme Microb. Technol.* 1998. V. 23. P. 518. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00081-7)
 9. *Chen X.L., Yang Q.C.* Effects of intermittent light exposure with red and blue light emitting diodes on growth and carbohydrate accumulation of lettuce // *Sci. Hort.* 2018. V. 234. P. 220. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.055>
 10. *Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.* Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V. 603. P. 591. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
 11. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: Pigment of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol.* 1987. V. 148. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
 12. *Kolupaev Y.E., Fisova E.N., Yastreb T.O., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V.* Effect of hydrogen sulfide donor on antioxidant state of wheat plants and their resistance to soil drought // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 59. <https://doi.org/10.1134/S1021443719010084>
 13. *Velikova V., Edreva A.* Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines // *Plant Sci.* 2000. V. 151. P. 59. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
 14. *Heath R.L., Packer L.* Photoperiodoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189.
 15. *Shibaeva T.G., Rubaeva A.A., Sherudilo E.G., Titov A.F.* Continuous lighting increases yield and nutritional value and decreases nitrate content in *Brassicaceae* microgreens // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70. P. 118. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601337>
 16. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G., Titov A.F.* The role of photosynthetic daily light integral in plant response to extended photoperiods // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 7. <https://doi.org/10.1134/S1021443722010216>
 17. *Llorente B., Martinez-Garcia J., Stange C., Rodriguez-Concepcion M.* Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017. V. 37. P. 49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.011>
 18. *Маслова Т.Г., Марковская Е.Ф., Слемнев Н.Н.* Функции каротиноидов в листьях высших растений (обзор) // *Журн. общ. биол.* 2020. Т. 81. С. 297. <https://doi.org/0.31857/S0044459620040065>
 19. *Shibaeva T.G., Sherudilo E.G., Rubaeva A.A., Titov A.F.* Continuous LED lighting enhances yield and nutritional value of four genotypes of *Brassicaceae* microgreens // *Planta*. 2022. V. 11. P. 176. <https://doi.org/10.3390/plants11020176>
 20. *Smillie R.M., Hetherington S.E.* Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress // *Photosynthetica*. 1999. V. 36. P. 451. <https://doi.org/10.1023/A:1007084321859>
 21. *Steyn W.J., Wand S.J.E.* Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection // *New Phytol.* 2002. V. 155. P. 349. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x>
 22. *Timmins G.S., Holbrook N.M., Field T.S.* Le rouge et le noir: Are anthocyanins plant melanins? // *Adv. Bot. Res.* 2002. V. 37. P. 17. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)37041-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)37041-1)
 23. *Nielsen S.L., Simonsen A.M.* Photosynthesis and photoinhibition in two differently coloured varieties of *Oxalis triangularis* — the effect of anthocyanin content // *Photosynthetica*. 2011. V. 49. P. 346. <https://doi.org/10.1007/s11099-011-0042-y>
 24. *Trojak M., Skowron E.* Role of anthocyanins in high-light stress response // *World Sci. News*. 2017. V. 81. P. 150.
 25. *Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников В.Н.* Функции и свойства антоцианов растительного сырья // *Труды БГУ.* 2010. Т. 4. С. 1.
 26. *Havaux M., Kloppstech K.* The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants // *Planta*. 2001. V. 213. P. 953. <https://doi.org/10.1007/s004250100572>
 27. *Olsson L., Veit M., Weissenböck G., Bornman J.* Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus* // *Phytochemistry*. 1998. V. 49. P. 1021.
 28. *Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E.* The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat // *Plant, Cell Environ.* 2001. V. 24. P. 881. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
 29. *Lois R., Buchanan B.B.* Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis* // *Planta*. 1994. V. 194. P. 504.

30. Neill S.O., Gould K.S., Kilmartin P.A., Mitchell K.A., Markham K.R. Antioxidant capacities of green and cyanic leaves in the sun species, *Quintinia serrata* // *Funct. Plant Biol.* 2002. V. 29. P. 1437.
<https://doi.org/10.1071/FP02100>
31. Neill S.O., Gould K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? // *Funct. Plant Biol.* 2003. V. 30. P. 865.
<https://doi.org/10.1071/FP03118>
32. Zang K.-M., Yu H.-J., Shi K., Zhou Y.-H., Yu J.-Q., Xia X.-J. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens* // *Plant Sci.* 2010. V. 179. P. 202.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2010.05.006>
33. Zhang T.-J., Chow W.S., Liu X.-T., Zhang P., Liu N., Peng C.-L. A magic red coat on the surface of young leaves: Anthocyanins distributed in trichome layer protect *Castanopsis fissa* leaves from photoinhibition // *Tree Physiol.* 2016. V. 36. P. 1296.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpw080>
34. Zhu H., Zhang T.J., Zheng J. Anthocyanins function as a light attenuator to compensate for insufficient photoprotection mediated by nonphotochemical quenching in young leaves of *Acmena acuminatissima* in winter // *Photosynthetica.* 2018. V. 56. P. 445.
<https://doi.org/10.1007/s11099-017-0740-1>
35. Kumar S., Pandey A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview // *Sci. World J.* 2013. Article ID 162750.
<https://doi.org/10.1155/2013/162750>
36. Pojer E., Mattivi F., Johnson D., Stockley C.S. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review // *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2013. V. 12. P. 483.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12024>
37. Lanoue J., St. Louis S., Little C., Hao X. Continuous lighting can improve yield and reduce energy costs while increasing or maintaining nutritional contents of microgreens // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13: 983222.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983222>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И РАЗЛИЧНЫХ СПЕКТРОВ МОНОХРОМАТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *Ipomoea batatas* (L.) Lam.¹

© 2023 г. Ю. А. Югай^{a, *}, О. В. Грищенко^a, Е. А. Васюткина^a, В. П. Григорчук^a,
Е. Н. Чухломина^a, Ж. Л. Цыденешиева^a, О. Д. Кудинова^a, Ю. Л. Ярошенко^a, А. И. Дегтяренко^a,
Е. П. Субботин^b, В. П. Булгаков^a, Ю. Н. Кульчин^b, Ю. Н. Шкрыль^a

^aФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт автоматики
и процессов управления Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

*e-mail: yuga1992@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

В работе изучили влияние регуляторов роста растений, а также воздействие монохроматического излучения различного спектрального состава на рост и накопление вторичных метаболитов в каллусной культуре овощного батата (*Ipomoea batatas* L.). Установлено, что аналоги ауксинов в низких концентрациях (0.5 мг/л) значительно стимулируют прирост биомассы клеток, при этом эффект 4-хлорфеноксиуксусной кислоты (4-ХФУК) был более выражен (стимуляция в 16 раз), чем у 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) (стимуляция в 13.5 раз). Как увеличение концентрации 2,4-Д и 4-ХФУК в среде, так и добавление цитокинина, 6-бензиламинопурина (БАП), приводило к существенному ингибированию роста культур (до 3 раз). В отличие от 2,4-Д, добавление 4-ХФУК приводило к 8-кратному повышению в культивируемых клетках суммарного содержания полифенольных соединений. Активирующее влияние 4-ХФУК на биосинтетические характеристики культуры клеток *I. batatas* сохранялось и при внесении БАП, тогда как увеличение концентрации 4-ХФУК приводило к нивелированию активирующего действия. Монохроматическое излучение – белый, красный (660 и 630 нм), желтый, зеленый, синий (440 и 460 нм) свет ингибировали рост (до 1.5 раз) и суммарное накопление вторичных метаболитов в клетках *I. batatas* (до 1.8 раз). При этом белый, яркий синий и красный спектры дифференцировано активировали образование отдельных соединений – 3,4-ди-кофеилхинной кислоты и 3-ферулоил-5-кофеилхинной кислоты. Таким образом, мы установили, что как аналоги ауксина, так и спектральное излучение проявляют различное влияние на ростовые и биосинтетические характеристики культуры *I. batatas*.

Ключевые слова: *Ipomoea batatas*, клеточная культура, регуляторы роста растений, монохроматическое излучение, вторичный метаболизм, кофеилхинные кислоты

DOI: 10.31857/S0015330323600808, **EDN:** BGODUV

ВВЕДЕНИЕ

Овощной батат (*Ipomoea batatas* L.) является продовольственной культурой, возделываемый преимущественно в странах Южной Америки и

Азии. *I. batatas* занимает 7 место в мире по объему производства после пшеницы, риса, кукурузы, картофеля, ячменя и маниоки [1]. Помимо питательной ценности, растения *I. batatas* синтезируют обширный спектр ценных вторичных метаболитов, включая антоцианы, каротиноиды, смесь фенольных кислот, прежде всего кофейную, хлорогеновую и производные кофеилхинной кислоты [2]. Изомеры кофейной кислоты, такие как хлорогеновая кислота (ХГК), моно- и ди-кофеилхинные кислоты (КХК) обладают противоопухолевой, антиоксидантной, гепатопротекторной, антидиабетическими и другими свойствами [2, 3].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600808 для авторизованных пользователей.

Сокращения: 4-ХФУК – 4-хлорфеноксиуксусная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин; ХГК – хлорогеновая кислота; 3,4-, 3,5- и 4,5-ди-КХК – 3,4-, 3,5- и 4,5-ди-кофеилхинные кислоты, соответственно; 3-К-5-КХК – 3-кафеоил-5-кумароилхинная кислота; 3-Ф-5-КХК – 3-ферулоил-5-кофеилхинная кислота; 3-К-5-ФХК – 3-кафеоил-5-ферулоилхинная кислота.

Например, было высказано предположение, что 3-КХК снижает риск развития диабета 2 типа за счет активации аденозинмонофосфат киназы (АМРК), в которой АМРК выступает в роли переключателя между расходом и производством АТФ [4]. Однако в большинстве фармакологических исследований в качестве источника КХК использовался кофе, что ограничивало масштабирование и интерпретацию результатов. Поэтому каллусная культура *I. batatas*, может служить моделью для изучения способов регуляции метаболизма ХГК, моно- и ди-КХК.

Ранее было показано, что в клубнеплодах овощного батата содержится скополин, который относится к кумаринам — классу фитохимических веществ, обладающих значительной биологической активностью и широко используемых в медицине и косметической промышленности [5]. Хотя многочисленные исследования показали, что различные кумарины встречаются в природе у нескольких видов растений, детали биосинтеза кумаринов и его регуляции изучены недостаточно хорошо. Ранее было показано, что кумарины (преимущественно скополин и скополетин) встречаются в корнях *Arabidopsis thaliana*, но до сих пор ничего не известно о природной вариации их накопления в этом модельном растении [5]. Общее содержание полифенолов в клубнеплодах было изучено в нескольких работах, однако полученные значения сильно отличались [6, 7]. Широкая вариабельность содержания полифенолов в овощном батате связана с его генетическим разнообразием [6]. На эту вариабельность также могут влиять такие факторы окружающей среды, как тип почвы, ультрафиолетовое излучение, количество осадков, степень спелости, а также метод выращивания [8].

На сегодняшний день технология культуры клеток растений является альтернативным источником природных соединений растительного происхождения. Вторичные метаболиты, полученные из культур тканей, могут быть получены в непрерывной системе производства и без экологических ограничений, поскольку физические условия, такие как температура, световой режим, доступность питательных веществ, pH и т.д., могут контролироваться в условиях *in vitro* [9]. Таким образом, подбор подходящей культуральной среды играет важную роль в производстве вторичных метаболитов. Использование таких компонентов среды, как макро- и микроэлементы, витамины, углеводы (сахара), аминокислоты и в особенности регуляторы роста растений, например, цитокинины и ауксины, могут индуцировать образование различных типов тканей и модулировать их продуктивность [10]. Более того, производство фитокомпонентов может быть усилено с помощью жасминовой и салициловой кислот [11], ионов металлов [12], наночастиц металлов [13],

или физических воздействий [14], а также с применением метаболической инженерии [15]. Одним из преимуществ использования фитогормонов является быстрое транскрипционное перепрограммирование, приводящее к согласованной активации всех метаболических путей только в тот момент, когда это необходимо [16]. Несмотря на это, существенным недостатком их использования является снижение роста и жизнеспособности клеток [17]. В качестве направленного способа регуляции биосинтеза вторичных метаболитов обычно используют методы генной инженерии. Однако этот подход требует глубокого понимания экспрессии генов, участвующих в биосинтезе и времени для получения трансгенных клеточных линий [18]. Другим недостатком использования трансгенных клеточных культур растений является нестабильность экспрессии генов в процессе культивирования. Описаны случаи понижения биосинтеза резвератрола в течение длительного периода культивирования *rolB*-экспрессирующей клеточной культуры *Vitis amurensis* [19]. И, наоборот, сообщалось, что культивирование *rolA*-экспрессирующих каллусов *R. cordifolia* в течение 10 лет демонстрировали не только стабильный рост, но и сохранили способность к сверхпродуктивности антрахинонов [20].

Среди физических воздействий свет является важным фактором, влияющим на ростовые характеристики и продукцию вторичных метаболитов [21]. В отличие от традиционных источников флуоресцентного света, используемых в культурах *in vitro*, светодиоды имеют множество преимуществ, включая монохроматический спектр, меньшее количество выделяемого тепла и экономичность [22]. Качество света и специфичность длины волны способствовали биосинтезу метаболитов у многих видов растений [23]. Было показано, что синий свет активировал рост и накопление фенольных кислот в клетках лимонника китайского (совместно с ди-бензоциклооктадиеновыми лигнандами) [24], фенольных соединений в каллусах *Gynura procumbens* [25]. Красный спектр стимулировал продукцию флавоноидов и фенольных соединений в клеточной культуре *Withania somnifera* [26]. Также известно, что зеленый тормозил рост культуры *in vitro* *Artemisia annua*, а синий свет, наоборот, активировал [27]. Bajwa с соавт. [23] показали, что постоянный белый свет обеспечил оптимальные условия для накопления биомассы и флавоноидов в каллусах *Moringa oleifera*, а синий 460 нм активировал накопление хлорогеновой кислоты. Многочисленные отчеты показали, что качество света влияет на морфологию и физиологию растений, которые значительно колеблются в зависимости от вида растений и конкретных метаболитов. Поэтому использование света кажется простым и экономически выгодным процессом для устойчивого производства важных вторичных метаболитов.

Применение культуры клеток как для научных, так и практических целей подразумевает оптимизацию условий для роста и биосинтеза целевых продуктов. Целью нашей работы было изучение влияния различных регуляторов роста и спектров монохроматического излучения на ростовые характеристики и накопление вторичных метаболитов в каллусных культурах *I. batatas*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клубнеплоды овощного батата *I. batatas* “Taizhong” были приобретены у местного поставщика (Dalian Jia Wei Cheng International Trading Co., Ltd.) и пророщены в хорошо дренированной песчаной почве (рН 6–6.5) в условиях искусственного освещения 16/8 (день/ночь) при 25°C. Листья 40-дневных растений овощного батата использовали для индукции каллуса. Листья стерилизовали в течение 10 мин в 5% растворе гипохлорита натрия и затем трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Дезинфицированные экспланты переносили на МС-среду [28], содержащую 6 г/л агара, 25 г/л сахарозы. Индукцию каллусообразования проводили на питательных средах с добавлением 1 мг/л 2,4-Д. Для изучения влияния фитогормонов на рост биомассы и профиль вторичных метаболитов в среды добавляли растительные гормоны: 2,4-Д (0.5 или 2 мг/л), а также 4-ХФУК и БАП (1 мг/л) (“Merck”, Германия) и пассировали в течение четырех циклов. Каллусы культивировали в темноте при 25 ± 1°C, пересадку проводили каждые 28 дней. Для всех экспериментов использовали равные навески клеточной биомассы по 150 мг.

Характеристику ростовых показателей проводили путем измерения веса сырой биомассы каждые 7 дней.

Индекс роста рассчитывали по формуле:

$$I = (m_{\max} - m_0) / m_0,$$

где m_0 и $m_{\max}$ начальная и максимальная (на 28 день цикла) масса каллуса, соответственно.

Удельную скорость роста рассчитывали по формуле:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1),$$

где X_2 и X_1 — значения критерия роста в момент времени t_2 и t_1 , соответственно. Удельную скорость роста рассчитывали для экспоненциальной фазы роста.

Время удвоения биомассы рассчитывали по формуле:

$$T_{\text{удв}} = \ln(2) / \mu,$$

где $\ln(2)$ — натуральный логарифм числа 2 (приближенно 0.6931), μ — удельная скорость роста.

Процент оводненности рассчитывали по формуле:

$$\text{Оводненность (\%)} = ((W_{\text{св}} - W_{\text{сух}}) / W_{\text{св}}) \times 100,$$

где $W_{\text{св}}$ — вес свежей ткани, $W_{\text{сух}}$ — вес сухой ткани.

Жизнеспособность культур клеток определяли посредством окрашивания клеток прижизненным красителем 0.1% раствора метиленового синего (“Merck”, Германия). Для подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток использовали световой микроскоп AxioScope 40 (“Carl Zeiss”, Германия).

Влияние света на ростовые характеристики и накопление вторичных метаболитов каллусами овощного батата проводили с использованием светодиодных источников освещения разного спектрального состава: полихромного белого (Б), монохромного глубокого красного (ГК, 660 нм), красного (К, 630 нм), желтого (Ж, 600 нм), зеленого (З, 514 нм), синего (С, 460) и яркого синего (ЯС, 440 нм). Источники освещения были установлены в специальный бокс с отдельными секциями, стенки которого были оклеены светоотражающим алюминиевым покрытием для равномерного рассеивания света [29]. Интенсивность излучения измеряли спектрофотометром ТКА-Спектр (НТП “ТКА”, Россия), в эксперименте она составляла 49 мкМ фотонов/(м² с). В данном эксперименте выращивание каллусных культур в темноте при 25 ± 1°C принимали за контроль.

Пробы для аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) готовили из 50 мг высушенной и измельченной каллусной ткани. В работе применяли два различных способа высушивания биомассы: с помощью бытового дегидрататора для овощей Polaris PFD 1005 (“Texton corporation LLC”, Китай) или лабораторного вакуумного концентратора Eppendorf Concentrator plus (“Eppendorf”, Германия) при 30°C в течение 2 ч. Экстракцию проводили 80% раствором метилового спирта. Гомогенаты обрабатывали в ультразвуковой бане при 40°C в течение 30 мин, затем инкубировали в течение 20 ч в темноте при комнатной температуре. Полученные экстракты центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g (“Beckman Coulter Microfuge” 22R, США). Надосадочную жидкость очищали с помощью 0.45 мкм фильтра (нейлон, Millipore, “Bedford”, МА, США) и затем использовали для ВЭЖХ-анализа.

ВЭЖХ анализ полученных экстрактов проводили на хроматографе 1260 Infinity (“Agilent”, США) как описано ранее [21]. Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм, “Agilent”, США) при 40°C. УФ-спектры записывали в диапазоне длин волн λ от 200 до 400 нм с использова-

Таблица 1. Характеристики роста каллусной культуры *I. batatas* при выращивании на средах с различными комбинациями регуляторов роста.

Содержание регуляторов роста в среде	Индекс роста	Удельная скорость роста, г/сут	Время удвоения биомассы, дни	Оводненность, %
2,4-Д* (0.5 мг/л)	13.57 ± 1.02 ^б	0.096 ± 0.0080 ^{аб}	7.2 ± 0.6 ^{вг}	91.4 ± 4.53 ^а
2,4-Д (2 мг/л)	6.53 ± 0.51 ^{гд}	0.072 ± 0.0068 ^{вг}	9.6 ± 0.8 ^{аб}	91.0 ± 3.68 ^а
2,4-Д + БАП (0.5/1 мг/л)	6.98 ± 0.55 ^г	0.074 ± 0.0070 ^{вг}	9.3 ± 0.6 ^{аб}	91.3 ± 4.12 ^а
2,4-Д + БАП (2/1 мг/л)	5.2 ± 0.41 ^д	0.065 ± 0.0061 ^г	10.6 ± 0.8 ^а	91.2 ± 3.87 ^а
4-ХФУК (0.5 мг/л)	16.08 ± 1.24 ^а	0.101 ± 0.0096 ^а	6.8 ± 0.4 ^г	90.9 ± 4.21 ^а
4-ХФУК (2 мг/л)	9.56 ± 0.75 ^в	0.084 ± 0.0069 ^{бв}	8.2 ± 0.6 ^{бв}	90.6 ± 3.74 ^а
4-ХФУК + БАП (0.5/1 мг/л)	5.48 ± 0.43 ^{гд}	0.066 ± 0.0052 ^г	10.4 ± 0.8 ^а	91.1 ± 3.96 ^а
4-ХФУК + БАП (2/1 мг/л)	6.46 ± 0.51 ^{гд}	0.072 ± 0.0068 ^{вг}	9.7 ± 0.8 ^{аб}	90.4 ± 4.1 ^а

Примечание: *4-ХФУК – 4-хлорфеноксиуксусная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – 6-бензил-аминопурин. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не различались по критерию наименьшей значимой разницы Фишера ($P < 0.05$).

нием детектора на диодной матрице G1315D (“Agilent”, США). Подвижная фаза состояла из раствора муравьиной кислоты (0.1%) в деионизированной воде (А) и ацетонитрила (Б). Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0.2 мл/мин: 0 мин 5% Б; 20 мин 30% Б; 30 мин 100% Б. УФ-сигнал для количественного определения записывали при $\lambda = 325$ нм. Расчет количественного содержания отдельных компонентов экстрактов производили методом абсолютной градуировки с использованием аналитических стандартов (Дополнительные материалы, рис. S1) (хлорогеновая кислота и цинарин, “Sigma-Aldrich”, США) как описано ранее [21]. Масс-спектрометрические данные получали с использованием тандемного масс-спектрометра Bruker HCT ultra PTM Discovery System (“Bruker Daltonik”, GmbH, Германия) оснащенного ионной ловушкой. Расчет количественного содержания отдельных компонентов экстрактов производили методом абсолютной калибровки с использованием аналитических стандартов: скополетин (“Serva-Feinbiochemica”, Германия), хлорогеновая кислота и цинарин (“Sigma-Aldrich”, США) как описано ранее [21].

Определение ростовых параметров, содержания вторичных метаболитов и жизнеспособности клеток проводили в трех биологических повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием пакета “Statistica” версии 13.0. Для сравнения средних более двух независимых выборок использовали дисперсионный анализ (ANOVA) по критерию наименьшей значимой разницы Фишера (LSD). Парные сравнения проводили с помощью t -критерия Стьюдента. Кри-

тический уровень значимости при проверке статистических гипотез составлял $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Регуляторы роста являются неотъемлемым элементом питательных сред для стимуляции деления и роста растительных клеток в условиях *in vitro*. Пролиферация растительных клеток оказывает влияние на формирование биомассы каллуса, что в свою очередь имеет значение для продукции ценных вторичных метаболитов. Чтобы определить оптимальное сочетание и концентрацию гормонов для клеточной культуры *I. batatas*, проводили культивирование каллусов в течение 28 дней на средах, содержащих регуляторы роста ауксиновой природы: 4-хлорфеноксиуксусную кислоту (4-ХФУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) как отдельно, так и в комбинации с 6-бензиламинопурином (БАП).

Наибольший индекс роста клеточной культуры был зарегистрирован на средах, содержащих 0.5 мг/л 2,4-Д или 4-ХФУК, и составил 13.57 и 16.08, соответственно (табл. 1). Однако следует отметить, что 4-ХФУК оказала более выраженное стимулирующее воздействие на накопление сырой биомассы по сравнению с 2,4-Д. При этом повышение концентрации этих ауксинов в питательной среде до 2 мг/л приводило к обратному эффекту – снижению индекса роста в 2 и 1.7 раза, соответственно. Совместное применение 0.5 мг/л 2,4-Д или 4-ХФУК с БАП вызвало почти двукратное понижение индекса роста культур по сравнению с действием этих ауксинов без добавления цитокинина. Наибольшая удельная скорость ро-

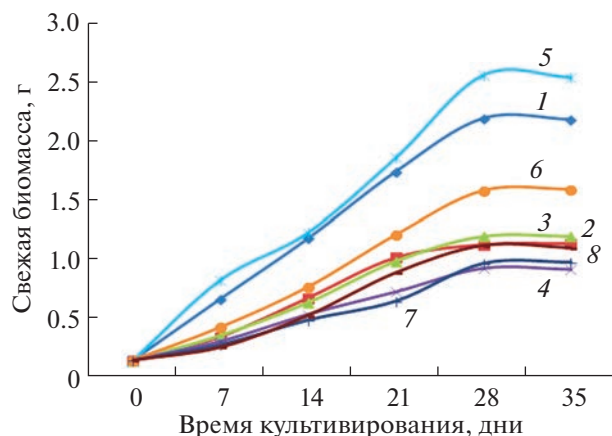


Рис. 1. Динамика роста каллусной культуры *I. batatas*, выращенной на питательных средах с различным сочетанием и концентрацией регуляторов роста: 1 — 2,4-Д (0.5 мг/л), 2 — 2,4-Д (2 мг/л), 3 — 2,4-Д + БАП (0.5/1 мг/л), 4 — 2,4-Д + БАП (2/1 мг/л), 5 — 4-ХФУК (0.5 мг/л), 6 — 4-ХФУК (2 мг/л), 7 — 4-ХФУК + БАП (0.5/1 мг/л), 8 — 4-ХФУК + БАП (2/1 мг/л).

ста 0.096 и 0.101 г/сут. была достигнута при выращивании каллусов на среде, содержащей 0.5 мг/л 2,4-Д или 4-ХФУК, соответственно (табл. 1). Наиболее быстрое удвоение биомассы каллусной культуры — 6.8 и 7.2 дней мы наблюдали при использовании 0.5 мг/л 4-ХФУК или 2,4-Д, соответственно (табл. 1). Интересно, что увеличение концентрации этих гормонов или использование в комбинации с БАП приводило к снижению удельной скорости роста и времени удвоения биомассы каллусов до 1.5 раз. Показатели оводненности каллусных культур, на всех протестированных средах достоверно не отличались (табл. 1).

Для изучения динамики роста клеток мы проводили измерение биомассы каждые 7 дней в течение всего периода культивирования (рис. 1). Было отмечено, что на всех типах сред лаг-фаза длилась 3–4 сут. После чего следовала фаза экспоненциального роста, которая продолжалась 25 дней, сменялась стадией замедления, а после четырех недель культивирования клетки вступали в стационарную фазу. Интересно, что на средах, содержащих 0.5 мг/л 2,4-Д или 4-ХФУК, всего через 2 нед. культивирования происходило 10-кратное увеличение биомассы клеток. При этом другие сочетания гормонов обеспечивали 4–8 кратный рост биомассы не менее, чем через 2 нед. культивирования.

Физиологическое состояние каллусных культур оценивали с использованием окрашивания клеток прижизненным красителем метиленовым синим. По окончании 4 нед. культивирования мы наблюдали высокий уровень жизнеспособности клеток, составляющий 70–80% (рис. 2). Отмечено, что клеточная культура, выращенная на среде с добавлением 0.5 мг/л 4-ХФУК, имела более однородную форму и размер клеток, а также обладала максимальным процентом живых клеток, по сравнению с другими вариантами питательной среды. На основании полученных результатов можно заключить, что аналог ауксина 4-ХФУК в концентрации 0.5 мг/л является оптимальным стимулятором роста каллусной культуры *I. batatas*. Поэтому все дальнейшие эксперименты проводились на каллусных тканях, выращенных на МС-среде с добавлением 0.5 мг/л 4-ХФУК.

С использованием ВЭЖХ-УФ-МС(/МС) в неочищенных экстрактах *I. batatas* были детектированы и охарактеризованы восемь соединений по-

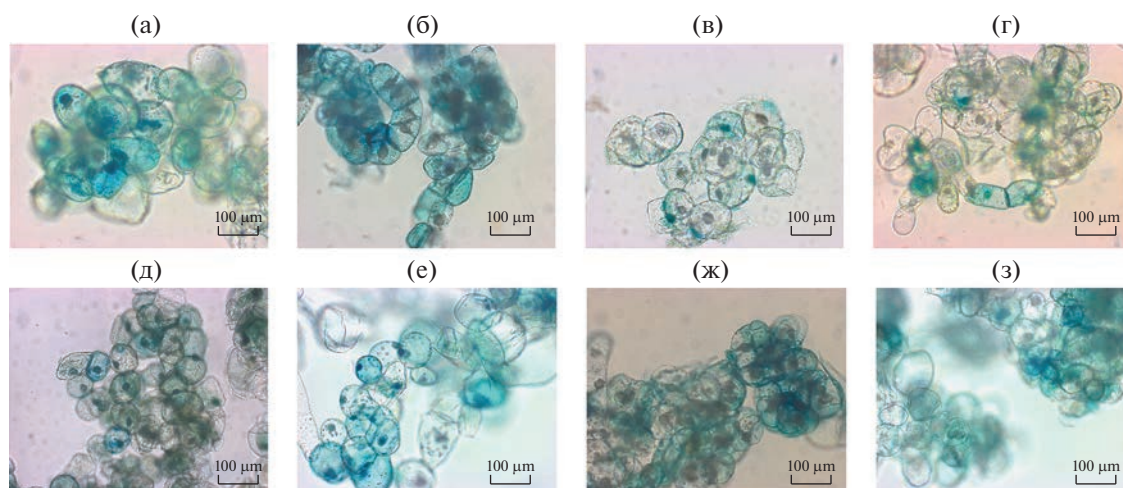


Рис. 2. Микрофотографии клеток каллусных культур *I. batatas*, выращенных на питательных средах с различным сочетанием и концентрацией регуляторов роста: (а) — 2,4-Д (0.5 мг/л), (б) — 2,4-Д (2 мг/л), (в) — 2,4-Д + БАП (0.5/1 мг/л), (г) — 2,4-Д + БАП (2/1 мг/л), (д) — 4-ХФУК (0.5 мг/л), (е) — 4-ХФУК (2 мг/л), (ж) — 4-ХФУК + БАП (0.5/1 мг/л), (з) — 4-ХФУК + БАП (2/1 мг/л).

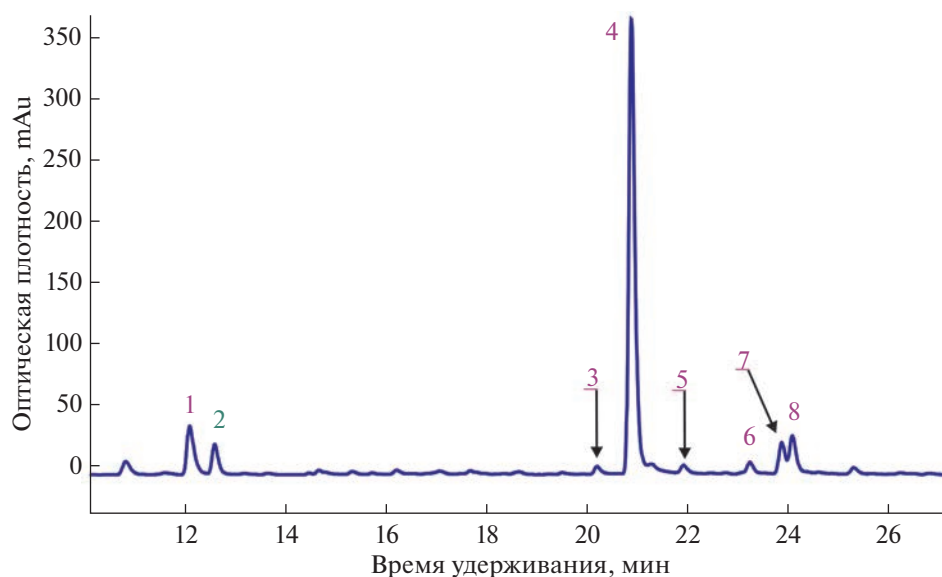


Рис. 3. Хроматографический профиль вторичных метаболитов (ВЭЖХ, 325нм) экстрактов каллусной культуры *I. batatas*, выращенной в контрольных условиях.

лифенольной природы (рис. 3; Дополнительные материалы, табл. S1). Семь из них — это производные кофейной и хинной кислот: 1 — хлорогеновая кислота (ХГК), 3-5 — 3,4-, 3,5-, 4,5-ди-кофеилхинные кислоты (ди-КХК) соответственно,

6 — 3-кафеоил-5-кумароилхинная кислота (3-К-5-КХК), 7 — 3-ферулоил-5-кофеилхинная кислота (3-Ф-5-КХК), 8 — 3-кафеоил-5-ферулоилхинная кислота (3-К-5-ФХК) [21]. Соединение 2 было идентифицировано благодаря его УФ-спектру (Дополнительные материалы, рис. S2) сходному со спектром стандартного образца скополетина и подтверждено масс-спектрометрическими данными (Дополнительные материалы, рис. S3) и определено как скополин (глюкозид скополетина).

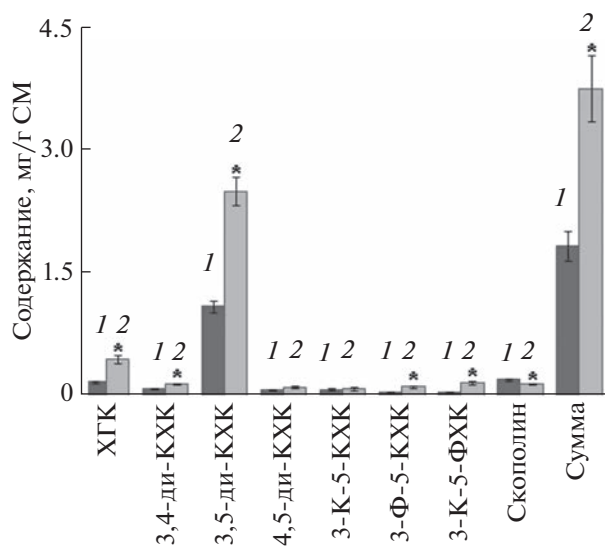


Рис. 4. Влияние условий сушки биомассы каллусов *I. batatas* на содержание вторичных метаболитов: 1 — вакуумный концентратор, 2 — бытовой дегидратор. ХГК — хлорогеновая кислота; 3,4-, 3,5- и 4,5-ди-КХК — 3,4-, 3,5- и 4,5-ди-кофеилхинные кислоты, соответственно; 3-К-5-КХК — 3-кафеоил-5-кумароилхинная кислота; 3-Ф-5-КХК — 3-ферулоил-5-кофеилхинная кислота; 3-К-5-ФХК — 3-кафеоил-5-ферулоилхинная кислота; СМ — сухая масса клеток. * — указывает на достоверность различий средних значений по *t*-критерию Стьюдента ($P < 0.05$).

Влияние способов сушки на содержание вторичных метаболитов

Прежде чем приступить к изучению действия различных факторов на вторичный метаболизм *I. batatas*, мы решили определить влияние условий сушки биомассы каллусов на содержание в них целевых метаболитов. Высушивание каллусных клеток в токе горячего воздуха с помощью бытового дегидратора является наиболее распространенным способом пробоподготовки растительной биомассы. Однако воздействие кислорода воздуха может способствовать окислительным процессам, тогда как использование вакуумного концентратора позволяет избежать прямого контакта образца с воздухом. Было установлено, что в пробах, высушенных в обычном дегидраторе общее содержание полифенолов в 2 раза превышало значения образцов, приготовленных с использованием вакуумного концентратора (рис. 4; Дополнительные материалы, рис. S4). При этом использование вакуумного концентратора способствовало более высокому содержанию скополина. Интересным является и

тот факт, что метод сушки не оказал значительного влияния на содержание 4,5-ди-КХК и 3-К-5-КХК. В связи с выявленными особенностями, всю дальнейшую пробоподготовку осуществляли в дегидрататоре.

Влияние регуляторов роста на накопление вторичных метаболитов в культуре *I. batatas*

Метаболический профиль каллусных культур *I. batatas* при воздействии различных сочетаний и концентраций гормонов в целом имел схожий состав (табл. 2). Во всех образцах преимущественно обнаружены такие соединения как ХГК, 3,5-ди-КХК и скополин (Дополнительные материалы, рис. S5). Исключение составляли лишь каллусы, выращенные на средах с повышенным содержанием 2,4-Д, накопление вторичных метаболитов в которых оказалось практически полностью ингибировано. Подобная тенденция прослеживалась и в отношении 4-ХФУК: повышение концентрации гормона снижало выход вторичных соединений в 9 раз. Наибольшее содержание полифенолов отмечено на средах с добавлением 0.5 мг/л 4-ХФУК как отдельно, так и в сочетании с БАП. Интересно отметить, что в присутствии 2,4-Д данный цитокинин способствовал активации вторичного метаболизма, тогда как в сочетании с 4-ХФУК, напротив, приводил к снижению продуктивности культивируемых клеток *I. batatas*. В то же время БАП в равной степени подавлял рост культур в присутствии обоих ауксинов.

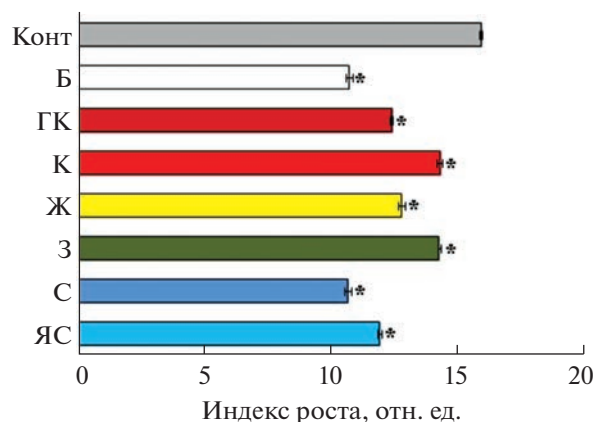


Рис. 5. Индекс роста каллусных культур *I. batatas* под воздействием различных спектров освещения. Конт — темнота; Б — белый; ГК — глубокий красный; К — красный; Ж — желтый; З — зеленый; С — синий; ЯС — яркий синий. * — указывает на достоверность различий средних значений по *t*-критерию Стьюдента ($P < 0.05$).

Влияние спектров монохроматического излучения на ростовые и биосинтетические характеристики клеточной культуры *I. batatas*

Далее мы изучили влияние монохроматического света различных спектров на рост биомассы и накопление вторичных метаболитов в каллусах *I. batatas*. В качестве контроля в данном эксперименте использовали культуру, выращенную в темноте. В целом, все спектры излучения вызывали значимое снижение индекса роста каллусных клеток *I. batatas* (рис. 5). Наибольший по-

Таблица 2. Содержание вторичных метаболитов в каллусной культуре *I. batatas*, выращенных на питательных средах с различным сочетанием и концентрацией регуляторов роста.

Содержание вторичных метаболитов, мг/г сухой массы	2,4-Д* (0.5 мг/л)	2,4-Д (2 мг/л)	2,4-Д + БАП (0.5/1 мг/л)	2,4-Д + БАП (2/1 мг/л)	4-ХФУК (0.5 мг/л)	4-ХФУК (2 мг/л)	4-ХФУК + БАП (0.5/1 мг/л)	4-ХФУК + БАП (2/1 мг/л)
ХГК**	0.12 ± 0.0136 ^Б	н.о.	0.18 ± 0.024 ^Б	н.о.	0.46 ± 0.060 ^А	0.09 ± 0.010 ^Б	0.41 ± 0.059 ^А	0.10 ± 0.009 ^Б
3,4-ди-КХК	0.03 ± 0.004 ^{БГ}	н.о.	0.04 ± 0.004 ^Б	н.о.	0.24 ± 0.023 ^А	0.02 ± 0.003 ^Г	0.09 ± 0.009 ^Б	0.02 ± 0.002 ^Г
3,5-ди-КХК	0.44 ± 0.054 ^Г	0.03 ± 0.003 ^А	0.94 ± 0.118 ^Б	0.03 ± 0.003 ^А	4.29 ± 0.575 ^А	0.41 ± 0.005 ^Г	2.53 ± 0.292 ^Б	0.34 ± 0.045 ^Г
4,5-ди-КХК	0.04 ± 0.004 ^Б	н.о.	0.04 ± 0.005 ^Б	н.о.	0.21 ± 0.029 ^А	0.02 ± 0.003 ^Г	0.10 ± 0.014 ^Б	0.02 ± 0.002 ^Г
3-К-5-КХК	0.04 ± 0.005 ^А	н.о.	0.06 ± 0.007 ^{ГД}	н.о.	0.21 ± 0.027 ^А	0.08 ± 0.009 ^{БГ}	0.14 ± 0.015 ^Б	0.06 ± 0.007 ^{ГД}
3-Ф-5-КХК	0.02 ± 0.002 ^Г	н.о.	0.05 ± 0.005 ^Б	н.о.	0.18 ± 0.019 ^А	0.01 ± 0.001 ^Г	0.11 ± 0.013 ^Б	0.02 ± 0.001 ^Г
3-К-5-ФХК	0.02 ± 0.002 ^Г	н.о.	0.04 ± 0.004 ^Б	н.о.	0.19 ± 0.021 ^А	0.01 ± 0.001 ^Г	0.11 ± 0.013 ^Б	0.01 ± 0.001 ^Г
Скополин	0.12 ± 0.013 ^Б	н.о.	0.23 ± 0.029 ^Б	н.о.	0.56 ± 0.062 ^А	0.08 ± 0.009 ^Г	0.27 ± 0.028 ^Б	0.13 ± 0.016 ^Б
Сумма	0.82 ± 0.097 ^Г	0.03 ± 0.003 ^А	1.58 ± 0.185 ^Б	0.03 ± 0.003 ^А	6.34 ± 0.761 ^А	0.71 ± 0.085 ^Г	3.75 ± 0.443 ^Б	0.69 ± 0.081 ^Г

Примечание: *4-ХФУК — 4-хлорфеноксиуксусная кислота; 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП — 6-бензил-аминопурин, **ХГК — хлорогеновая кислота; 3,4-, 3,5- и 4,5-ди-КХК — 3,4-, 3,5- и 4,5-ди-кофеилхиновые кислоты, соответственно; 3-К-5-КХК — 3-кафеоил-5-кумароилхиновая кислота; 3-Ф-5-КХК — 3-ферулоил-5-кофеилхиновая кислота; 3-К-5-ФХК — 3-кафеоил-5-ферулоилхиновая кислота, н.о., соединение не обнаружено. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не различались по критерию наименьшей значимой разницы Фишера ($P < 0.05$).

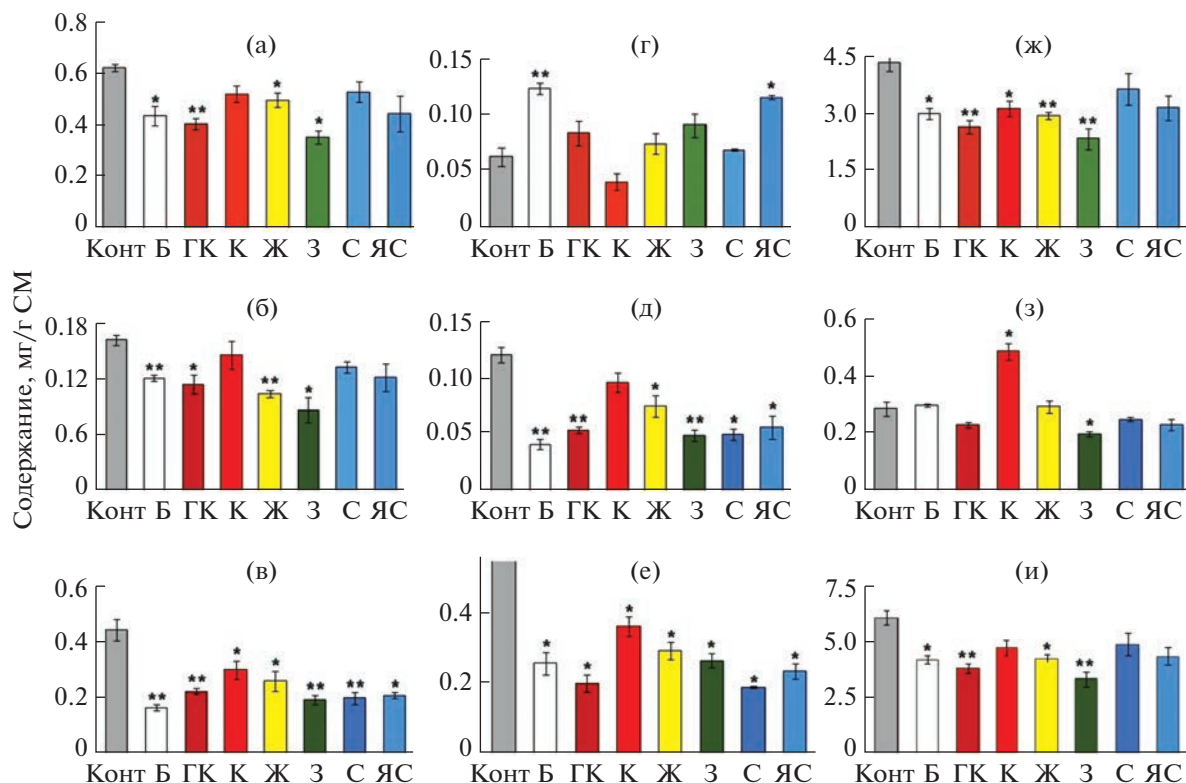


Рис. 6. Влияние различных спектров освещения на синтез вторичных метаболитов в клеточной культуре *I. batatas*: (а) – ХГК, (б) – 4,5-ди-КХК, (в) – 3-К-5-ФХК, (г) – 3,4-ди-КХК, (д) – 3-К-5-КХК, (е) – скополин, (ж) – 3,5-ди-КХК, (з) – 3-Ф-5-ХК, (и) – сумма вторичных метаболитов. Конт – темнота; Б – белый; ГК – глубокий красный; К – красный; Ж – желтый; З – зеленый; С – синий; ЯС – яркий синий. * – указывает на достоверность различий средних значений по *t*-критерию Стьюдента ($P < 0.05$).

давяющий эффект отмечен при использовании белого и синего спектров.

Воздействие света также приводило к снижению накопления вторичных метаболитов (рис. 6; Дополнительные материалы, рис. S6). В каллусах, выращенных в контрольных условиях, содержание КХК было максимальным и составило 6.1 мг/г сухой массы. Содержание производных КХК в каллусах под воздействием зеленого и глубокого красного спектров было снижено в 1.8 и 1.6 раз, соответственно, по сравнению с контролем. Пониженное содержание КХК также наблюдалось в каллусах, выращенных под воздействием синего и яркого синего спектров освещения, однако разница с контролем в них не была статистически достоверна. Все типы монохромного излучения значительно снижали содержание скополина с наиболее выраженным влиянием глубокого красного и синего спектров освещения. Интересно, что воздействие света на накопление одного из минорных компонентов клеточной культуры *I. batatas*, 3,4-ди-КХК, отличалось. Так белый и ярко синий спектры вызвали двукратное увеличение содержания данного соединения, в то время как другие типы спектров не оказывали су-

щественного влияния на накопление вторичных метаболитов. Подобное дифференцированное воздействие отмечено также для 3-Ф-5-КХК, содержание которого увеличилось в 1.8 раза только под воздействием красного спектра света, в то время как зеленый свет достоверно снижал ее содержание. Стоит отметить, что два красных и два синих варианта освещения, хотя и имеют разницу всего в 30 и 20 нм, соответственно, значительно отличались по своему воздействию на синтез практически всех изученных производных ХГК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Овощной батат является одним из ключевых культурных растений в мировом аграрном секторе. Изучение сладкого картофеля с позиции физиологии и биотехнологии растений открывает новые возможности для оптимизации его качества, устойчивости к болезням и стрессам, а также улучшения питательных характеристик. Применение клеточных культур в этом контексте имеет ряд преимуществ. Клеточные культуры являются альтернативной модельной системой для изучения молекулярных и клеточных реакций на раз-

личные абиотические и биотические стрессы [21]. Накопление вторичных метаболитов в растениях подвержено влиянию многих внешних факторов, что затрудняет их использование для получения ценных вторичных метаболитов. В то же время клеточные культуры, рост которых осуществляется в контролируемых условиях, являются стабильным и воспроизводимым источником активных соединений [30].

В настоящей работе изучено влияние гормональных и спектральных условий культивирования на ростовые и биосинтетические характеристики клеточной культуры овощного батата, как продуцента соединений полифенольной природы — производных КХК. Анализ ростовых характеристик каллусной культуры *I. batatas* в присутствии различных регуляторов роста показал существенные различия. Наличие в среде 0.5 мг/л 4-ХФУК или 2,4-Д в качестве ауксинов вызывало двукратное повышение индекса роста каллусной культуры по сравнению с другими сочетаниями и концентрациями фитогормонов. При этом было показано, что каллусы *I. batatas* сортов Пурпл, Jewel и Порто Рико демонстрировали наилучшую пролиферацию на МС-среде в присутствии 1 мг/л НУК [31]. Цитокинин БАП оказывал ингибирующее влияние на рост культуры, как в комбинации с 4-ХФУК, так и с 2,4-Д при всех изученных концентрациях ауксинов. Ранее было показано, что 2.6 мкМ 4-ХФУК эффективнее стимулировали пролиферацию каллусных клеток *Ananas comosus* по сравнению с 2,4-Д [32]. Вероятно, высокая эффективность 4-ХФУК может быть связана с более высокой скоростью поглощения и метаболизма по сравнению с 2,4-Д. Ранее было показано, что время мобилизации 2,4-Д в тканях растений значительно уступает другим ауксинам [33]. Отличия в скорости реакции известны и для других ауксинов, например, 1-нафтилуксусная кислота действует в шесть раз быстрее, чем индолил-3-уксусная кислота [34]. Помимо активирующего эффекта на ростовые параметры присутствие в среде 0.5 мг/л 4-ХФУК способствовало максимальному суммарному накоплению вторичных метаболитов, которое в 2–6 раз превышало другие сочетания и концентрации гормонов. Было показано, что содержание производных кофейной кислоты в каллусах козельца лучистого (*Scorzonera radiata*) достигало 27.95 мкг/г сухой массы клеток [35], что в 4.4 раза выше их содержания в каллусной культуре *I. batatas*. В то же время в каллусной культуре артишока испанского (*Cynara cardunculus*) продукция этих метаболитов составляла всего 1.5 мг/г сухого веса [36]. Содержание скополина в каллусной культуре, выращенной в присутствии 4-ХФУК, в 10 раз превышало его содержание в клубнеплодах *I. batatas* (0.058 мг/г от сухой массы) [4]. Стоит отметить, что несмотря на то, что высокие дозы 4-ХФУК и 2,4-Д (2 мг/л) оказывали

схожее влияние на пролиферацию клеток, их эффект на биосинтетический потенциал *I. batatas* отличался и выражался в практически полном ингибировании накопления вторичных соединений под действием 2,4-Д. Этот результат указывает на существенное различие в действии данных ауксинов на ростовые и биосинтетические характеристики культуры овощного батата. Интересно, что подобный эффект фитогормонов был ранее описан в культуре якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris*). Авторы обнаружили, что 2,4-Д способствовал более активному росту клеток, тогда как 1-нафтилуксусная кислота индуцировала цитодифференцировку и накопление вторичных соединений [37].

В то же время влияние спектрального излучения на вторичный метаболизм клеточных культур в настоящее время изучено еще недостаточно. Полученные нами результаты свидетельствуют об общей ингибирующей активности спектров освещения в отношении роста и накопления вторичных метаболитов в каллусной культуре овощного батата. Эти данные согласуются с результатами предыдущих экспериментов, в которых было показано, что воздействие салициловой, жасминовой кислот и нитропруссиды натрия оказывает активирующее влияние на вторичный метаболизм *I. batatas*, в то время как физические воздействия способствуют его ингибированию [21]. При этом в данном исследовании мы установили, что различные типы светового излучения действовали на физиологические и биохимические параметры клеток по-разному. Например, наибольшее ингибирующее действие на пролиферацию клеток отмечено для синего и белого спектра, тогда как эффект зеленого и красного света был выражен не так значительно. В то же время в отношении суммарного содержания вторичных метаболитов именно действие зеленого спектра привело к максимальному ингибированию. Свет различной интенсивности и спектра является важным индуктором морфогенеза и фотосинтеза [14]. Очевидно, в условиях темноты данные процессы отсутствуют (или их уровень низок), в результате чего каллусные клетки могут переключаться на альтернативные метаболические пути, включая пути синтеза вторичных метаболитов. Таким образом, как и в случае с аналогами ауксина, проявляется альтернативное влияние различных спектров на ростовые и биосинтетические характеристики культуры. Более того, разный спектр света оказывал дифференцированное влияние и на образование отдельных производных КХК. Было отмечено, что белый и яркий синий свет способствовали двукратному увеличению концентрации 3,4-ди-КХК. В то время как красный, единственный из всех испытанных спектров, вызывал почти двукратное увеличение накопления 3-Ф-5-КХК. Аналогичное действие на вторичный метаболизм

были отмечены ранее при коротком воздействии белого света на каллусную культуру *Flacourtia indica* [38]. В работе Szora с соавт. [24] показано, что синий свет вызывал трехкратное увеличение (до 0.47 мг/г сухой массы) ХГК и других фенольных соединений в каллусах *Schizandra chinensis*. Более того, красный свет способствовал накоплению ХГК до 11.6 мг/г сухого веса в каллусах *Withania somnifera* [26]. Различные производные КХК могут проявлять специфические фармакологические свойства. Например, в экспериментах *in vivo* установлено, что 3,5-ди-КХК снижала дефицит обучения и памяти в модели ускоренного старения SAMP8 [39], а различные сочетания отдельных ди-КХК в разной степени улучшали когнитивные способности в модели патологии, связанной с накоплением амилоидов- β у мышей [40]. Таким образом, дифференцированное влияние отдельных спектральных излучений можно использовать для направленной активации отдельных активных соединений. Например, в случае с клеточной культурой *I. batatas* белый, яркий синий и красный спектры можно рассматривать как эффективные физические факторы активации образования 3,4-ди-КХК и 3-Ф-5-КХК.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 22-24-00082). Исследование выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nawiri S.O., Oduor R.O., Jalemba A.M. Genetic engineering of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) using isopentenyl transferase gene for enhanced drought tolerance // Asian J. Agric. 2017. V. 1. P. 85. <https://doi.org/10.13057/asianjagric/g010206>
2. Phahlane C.J., Laurie S.M., Shoko T., Manhivi V.E., Sivakumar D. Comparison of caffeoylquinic acids and functional properties of domestic sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) storage roots with established overseas varieties // Foods. 2022. V. 11. P. 1329. <https://doi.org/10.3390/foods11091329>
3. Tanaka M., Ishiguro K., Oki T., Okuno S. Functional components in sweetpotato and their genetic improvement // Breed Sci. 2017. V. 67. P. 52. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16125>
4. Santana-Gálvez J., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D. Chlorogenic acid: recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome // Molecules. 2017. V. 22. P. 358. <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>
5. Kai K., Shimizu B., Mizutani M., Watanabe K., Sakata K. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana* // Phytochem. 2006. V. 67. P. 379. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.006>
6. Teow C.C., Truong V.-D., McFeeters R.F., Thompson R.L., Pecota K.V., Yencho G.C. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours // Food Chem. 2007. V. 103. P. 829. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.033>
7. Truong V.-D., McFeeters R.F., Thompson R.T., Dean L.L., Shofran B. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars in the United States // J. Food Sci. 2007. V. 72. P. C343. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00415.x>
8. Alam M., Rana Z., Islam S. Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh // Foods. 2016. V. 5. P. 64. <https://doi.org/10.3390/foods5030064>
9. Kozai T., Kubota C., Ryoung Jeong B. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 1997. V. 51. P. 49. <https://doi.org/10.1023/A:1005809518371>
10. Wawrosch C., Zotchev S.B. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook // Appl. Microbiol. Biotech. 2021. V. 105. P. 6649. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>
11. Thiruvengadam M., Rekha K., Rajakumar G., Lee T.-J., Kim S.-H., Chung I.-M. Enhanced production of anthraquinones and phenolic compounds and biological activities in the cell suspension cultures of *Polygonum multiflorum* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 1912. <https://doi.org/10.3390/ijms17111912>
12. Khan H., Khan T., Ahmad N., Zaman G., Khan T., Ahmad W., Batool S., Hussain Z., Drouet S., Hano C., Abbasi B.H. Chemical elicitors-induced variation in cellular biomass, biosynthesis of secondary cell products, and antioxidant system in callus cultures of *Fagonia indica* // Molecules. 2021. V. 26. P. 6340. <https://doi.org/10.3390/molecules26216340>
13. Chung I.M., Rekha K., Rajakumar G., Thiruvengadam M. Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter melon // Biotech. 2018. V. 8. P. 412. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1439-0>
14. Hashim M., Ahmad B., Drouet S., Hano C., Abbasi B.H., Anjum S. Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants in vitro cultures // Plants. 2021. V. 10. P. 1521. <https://doi.org/10.3390/plants10081521>
15. Mipeshwaree Devi A., Khedashwori Devi K., Premi Devi P., Lakshmi Priyari Devi M., Das S. Metabolic engineering

- of plant secondary metabolites: prospects and its technological challenges // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14. P. 1171154.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1171154>
16. De Geyter N., Gholami A., Goormachtig S., Goossens A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. P. 349.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>
 17. Halder M., Sarkar S., Jha S. Elicitation: a biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures // *Eng. Life Sci.* 2019. V. 19. P. 880.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>
 18. Sanchez-Muñoz R., Moyano E., Khojasteh A., Bonfill M., Cusido R.M., Palazon J. Genomic methylation in plant cell cultures: a barrier to the development of commercial long-term biofactories // *Eng. Life Sci.* 2019. V. 19. P. 872.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201900024>
 19. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Effect of long-term cultivation on resveratrol accumulation in a high-producing cell culture of *Vitis amurensis* // *Acta Physiol. Plant.* 2012. V. 34. P. 1101.
<https://doi.org/10.1007/s11738-011-0907-5>
 20. Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Silantjeva S.A., Makhazen D.S., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Vasileva E.A. Activation of anthraquinone biosynthesis in long-cultured callus culture of *Rubia cordifolia* transformed with the rolA plant oncogene // *J. Biotech.* 2019. V. 306. P. 38.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.007>
 21. Vasyutkina E.A., Yugay Y.A., Grigorchuk V.P., Grishchenko O.V., Sorokina M.R., Yaroshenko Y.L., Kudina O.D., Stepochkina V.D., Bulgakov V.P., Shkryl Y.N. Effect of stress signals and Ib-rolB/C overexpression on secondary metabolite biosynthesis in cell cultures of *Ipomoea batatas* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 15100.
<https://doi.org/10.3390/ijms232315100>
 22. Bantis F., Smirnakou S., Ouzounis T., Koukounaras A., Ntagkas N., Radoglou K. Current status and recent achievements in the field of horticulture with the use of light-emitting diodes (LEDs) // *Sci. Hortic.* 2018. V. 235. P. 437.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.058>
 23. Bajwa M.N., Khanum M., Zaman G., Ullah M.A., Farooq U., Waqas M., Ahmad N., Hano C., Abbasi B.H. Effect of wide-spectrum monochromatic lights on growth, phytochemistry, nutraceuticals, and antioxidant potential of in vitro callus cultures of *Moringa oleifera* // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 1497.
<https://doi.org/10.3390/molecules28031497>
 24. Szopa A., Ekiert H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures in vitro // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2016. V. 127. P. 115.
<https://doi.org/10.1007/s11240-016-1034-1>
 25. Lian T.T., Cha S.-Y., Moe M.M., Kim Y.J., Bang K.S. Effects of different colored LEDs on the enhancement of biologically active ingredients in callus cultures of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 4336.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234336>
 26. Adil M., Haider Abbasi B., Ul Haq I. Red light controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. // *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2019. V. 24 P. e00380.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00380>
 27. Песак С.В. Действие селективного света на рост клеточных культур растения *Artemisia annua* L. // *Вестник Томского гос. университета. Биология.* 2010. № 2. С. 29.
 28. Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
 29. Grishchenko O.V., Subbotin E.P., Gafitskaya I.V., Vereshchagina Y.V., Burkovskaya E.V., Khrolenko Y.A., Grigorchuk V.P., Nakonechnaya O.V., Bulgakov V.P., Kulchin Y.N. Growth of micropropagated *Solanum tuberosum* L. plantlets under artificial solar spectrum and different mono- and polychromatic LED lights // *Hortic. Plant J.* 2022. V. 8. P. 205.
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.04.007>
 30. Yue W., Ming Q.L., Lin B., Rahman K., Zheng C.J., Han T., Qin L.P. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. V. 36. P. 215.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923986>
 31. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., Абубакаров Х.Г., Зайцева С.М. Влияние гормонального состава питательной среды и эндогенных полифенолов на формирование каллусной ткани *Ipomoea batatas* (L.) // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2022. № 11. С. 46.
 32. De Silva A.E., Kadir M.A., Aziz M.A., Kadzimin S. Proliferation potential of 18-month-old callus of *Ananas comosus* L. cv. Moris. // *Sci. World J.* 2006. V. 6. P. 169.
<https://doi.org/10.1100/tsw.2006.34>
 33. Peeters A.J., Gerards W., Barendse G.W., Wullems G.J. In vitro flower bud formation in tobacco: interaction of hormones // *Plant Physiol.* 1991. V. 97. P. 402.
<https://doi.org/10.1104/PP.97.1.402>
 34. De Klerk G.J., Brugge J.T., Marinova S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in *Malus* 'Jork 9' // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1997. V. 49. P. 39.
<https://doi.org/10.1023/A:1005850222973>
 35. Grishchenko O.V., Grigorchuk V.P., Tchernoded G.K., Koren O.G., Bulgakov V.P. Callus culture of *Scorzonera radiata* as a new, highly productive and stable source of caffeoylquinic acids // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 7989.
<https://doi.org/10.3390/molecules27227989>
 36. Vereshchagina Y.V., Bulgakov V.P., Grigorchuk V.P., Rybin V.G., Veremeichik G.N., Tchernoded G.K., Gorpenchenko T.Y., Koren O.G., Phan N.H.T., Minh N.T., Chau L.T., Zhuravlev Y.N. The rolC gene increases caffeoylquinic acid production in transformed arti-

- choke cells // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 7773.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5869-2>
37. Томилова С.В., Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Ключин А.Г., Носов А.М. Влияние синтетических аналогов ауксинов — 2,4-Д и α -НУК — на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. // Физиология растений. 2020. Т. 67. С. 389.
<https://doi.org/10.31857/S001533032004017X>
38. Khan T., Ullah M.A., Garros L., Hano C., Abbasi B.H. Synergistic effects of melatonin and distinct spectral lights for enhanced production of anti-cancerous compounds in callus cultures of *Fagonia indica* // J. Photochem. Photobiol. B. 2019. V. 190. P. 163.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.010>
39. Han J., Miyamae Y., Shigemori H., Isoda H. Neuroprotective effect of 3,5-di-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1 // Neurosci. 2010. V. 169. P. 1039.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.049>
40. Matthews D.G., Caruso M., Alcazar Magana A., Wright K.M., Maier C.S., Stevens J.F., Gray N.E., Quinn J.F., Soumyanath A. Caffeoylquinic acids in *Centella asiatica* reverse cognitive deficits in male 5XFAD alzheimer's disease model mice // Nutrients. 2020. V. 12. P. 3488.
<https://doi.org/10.3390/nu12113488>

УДК 581.1

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИНЗЕНОЗИДОВ В МОРФОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО (*Panax ginseng* С.А. Meyer)¹

© 2023 г. Т. Ю. Горпенченко^{а, *}, В. П. Григорчук^а, В. В. Маханьков^б, Д. В. Кочкин^{с, д}, Ю. В. Воложанина^а, М. Т. Ханды^а, Г. К. Чернодед^а, Ю. Н. Журавлев^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук”, Владивосток, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^дФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

*e-mail: gorpenchenko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 04.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Методом ВЭЖХ-МС определен состав тритерпеновых гликозидов в разных тканях клеточных линий (PgR – ризогенная и PgG – геммогенная) *in vitro* и корней интактных растений женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С.А. Meyer), выращиваемых на плантациях в Приморском крае Российской Федерации. Обнаружено и охарактеризовано более 60 тритерпеновых гликозидов. Максимальное содержание гинзенозидов идентифицировано в листьях геммогенной линии. Общее количество гинзенозидов в эмбриональной ткани линии PgG было ниже, по сравнению со всеми другими исследованными образцами, в основном, за счет количества протопанаксадиолов. Во всех частях линии PgR содержание протопанаксатриола Re было в два раза выше, по сравнению с корнем интактного растения. В базальной части каллусов PgR и PgG обнаружено высокое содержание протопанаксатриолов и олеаноловых гинзенозидов. Таким образом, морфогенные клеточные линии повторяют не только паттерн качественного состава гинзенозидов, по сравнению с отдельными частями нативных корней и листьев, но и увеличивают их разнообразие и количество.

Ключевые слова: *Panax ginseng*, гинзенозиды, женьшень, культура клеток растений, морфогенная культура, тритерпеновые гликозиды

DOI: 10.31857/S0015330323601036, EDN: ATLJPG

ВВЕДЕНИЕ

Женьшень настоящий (*Panax ginseng* С.А. Meyer) является одной из визитных карточек Дальнего Востока России. Несомненна его роль и в экономике Азиатско-Тихоокеанского региона, как ценного лекарственного и промышленного растения [1]. На рынок продукции с добавлением экстрактов женьшеня постоянно выходят новые товары как отечественного, так и зарубежного производства. Для женьшеня характерными и основными биологически активными веществами являются тритерпеновые гликозиды (сапонины), имеющие общее групповое наименование — гин-

зенозиды. Гинзенозиды обладают различными терапевтическими эффектами: противовоспалительным, противоаллергическим, антиоксидантным, антидиабетическим и противоопухолевым [2, 3]. На сегодняшний день известно более 300 различных гинзенозидов из разных видов женьшеня [2, 3]. Основное значение имеют гинзенозиды с тетрациклическими агликонами даммаранового ряда — 20(S)-протопанаксадиолом (PPD) и 20(S)-протопанаксатриолом (PPT), и производные окотиллола (Oct) — продукта дополнительной модификации боковой цепи даммаранового скелета [3]. Кроме того, фармакологически важными являются тритерпеновые гликозиды, имеющие пентациклический агликон — олеаноловая кислота (Ole) [3, 4]. В современной медицине при разработке фармакологических препаратов ис-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323601036 для авторизованных пользователей.

пользуется одно активное вещество, чье действие тщательно исследуется на протяжении долгого периода времени. В случае женьшеня, исследования обычно сосредоточены на изучении одного определенного вещества из группы гинзенозидов для выявления механизмов, определяющих его терапевтическую активность [3]. В этом случае возникает проблема выделения индивидуальных гинзенозидов в количествах, достаточных для биологических испытаний.

У растений биосинтез и накопление вторичных метаболитов связаны с различными типами клеток, включая эпидермис, эндодерму, перicycle, паренхиму флоэмы, ситовидные элементы флоэмы и клетки-компаньоны, специализированный мезофилл и др. В настоящее время для фитохимического анализа тритерпеновых гликозидов в образцах цветочных бутонов, листьев, корневищ и корней интактных растений *Panax spp.* в основном используются различные варианты жидкостной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ- или УВЭЖХ-МС и т.д.) [5–8]. Только использование таких чувствительных и селективных методов как, например, ВЭЖХ-МС позволяет продуктивно и точно проводить рутинный анализ разных образцов женьшеня и продуктов из него, каждый из которых может содержать десятки (а в некоторых случаях и сотни) индивидуальных гинзенозидов [2, 9].

Культивируемые *in vitro* растительные клетки являются альтернативой плантационным и дикорастущим растениям, используемым для получения конечного продукта — очищенных биологически активных веществ, индивидуальных или в составе смесей. В асептических условиях также можно культивировать сами растения (микрорклоны), ткани или органы растений, в которых накапливаются целевые метаболиты. Например, известны случаи промышленного использования культур корней разных видов *Panax* для получения гинзенозидов [9, 10], микрорклонов *Trigonella spp.* — для наработки производных диосгенина, листьев *Catharanthus roseus* — для выделения винбластина, культуры клеток *Dioscorea deltoidea* — для получения стероидных гликозидов [11, 12]. Особый интерес представляют разные варианты культур клеток растений — наиболее универсальный и разнообразный тип культивируемых *in vitro* растительных объектов. Известно, что качественный и количественный состав вторичных метаболитов в культивируемых *in vitro* дедифференцированных растительных клетках отличается от интактных растений [11, 13]. Культуры клеток могут различаться по типу выращивания (каллусные, суспензионные), продолжительности выращивания и физиологическим характеристикам (первичные, “молодые”, длительно выращиваемые культуры), по способу выращивания

(выращивание в колбах, биореакторах) и т.д. При этом каждый из вариантов культур клеток растений обладает своими уникальными свойствами и физиолого-биохимическими особенностями. Такое разнообразие культур клеток растений представляет уникальную возможность для самых разных фундаментальных, практико-ориентированных исследований и создания новых технологий в области изучения биологически активных веществ растений.

Методы биотехнологии позволяют получить клеточные линии с преобладанием конкретных групп вторичных метаболитов, изучать и направлять процессы биосинтеза и накопления этих веществ [9]. В каллусных культурах, состоящих из одного типа клеток, одной из проблем получения целевых метаболитов может быть ограничение, связанное с последовательным биосинтезом вещества: когда предшественник синтезируется в одном органе растения, а затем перемещается в другой для завершения биосинтетических процессов и/или накопления [12]. Это напрямую зависит от направления и характера развития дифференцировки растительных клеток. В таких случаях практически невозможно производство клеточных линий с высоким уровнем накопления конечного вещества, т.к. отсутствуют высокоспециализированные клетки, осуществляющие синтез промежуточных веществ [11]. С другой стороны, в клеточных линиях находят новые вещества и/или формы/производные известных веществ, которые не характерны и/или являются минорными в интактных растениях [14, 15]. Эти особенности клеточных культур требуют детального изучения вторичного метаболизма в различных длительно культивируемых морфогенных клеточных культурах, образующих отдельные ткани и органы.

Большинство работ по морфогенезу в клеточных линиях различных видов женьшеня нацелены на формирование соматических зародышей в культуре тканей для размножения и получения искусственных семян [10]. Исследования геммогенеза *in vitro* также направлены на успешную регенерацию растений женьшеня [10]. Литературные данные по продукции гинзенозидов в геммогенных линиях ограничены [10]. Наибольшее значение для получения высокого выхода гинзенозидов имеет изучение ризогенных клеточных культур при культивировании в биореакторах [10, 16]. В разных работах путем добавления различных элиситоров на разных вариантах питательных сред удалось достичь продукции общего количества основных гинзенозидов до 7.29 мг/г сухого веса и 29-кратного увеличения содержания при контрольных значениях 2.07% [10]. Оценка различных клеточных линий в этом случае велась по основным группам гинзенозидов и отмечена их нестабильность при долговременном культивировании. Только в последнее время появились

работы по поиску и характеристике минорных соединений в длительно культивируемых недифференцированных клеточных линиях различных видов женьшеня [14, 15, 17, 18]. Рассматриваются возможности преобразования основных гинзенозидов в уникальные соединения в бактериальных системах [19]. Эти работы ограничиваются недостатком знаний о продукции редких гинзенозидов не только в клеточных линиях, но и в интактных растениях. В настоящей работе впервые проанализирован качественный и количественный состав тканей и органов длительно культивируемых органогенных клеточных линий женьшеня настоящего, сохраняющих свой морфогенный потенциал, что послужит основой для выделения и анализа минорных гинзенозидов.

Цель работы — определение и анализ содержания гинзенозидов в двух морфогенных клеточных линиях *P. ginseng*, которые поддерживаются в активно растущем состоянии более 6 лет, с помощью ВЭЖХ-МС в сравнении с корнями плантационных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объектов исследования использовали морфогенные клеточные линии PgR (ризогенная) и PgG (геммогенная) *Panax ginseng* С.А. Meyer, культивируемые более 6 лет, а также среднюю часть основных корней 6-летнего растения *P. ginseng*, выращенного на плантациях в Приморском крае РФ и выкопанного в конце августа 2021 г. Суммарные образцы для экстрагирования клеточных линий были отобраны с трех различных пассажей и из средней части трех корней плантационных растений.

Получение культур клеток. Клеточные культуры PgR и PgG были получены в лаборатории биотехнологии в 2017 г. из незрелых завязей женьшеня. Для индукции побегообразования использовали модифицированную питательную среду Chang и Hsing [20], содержащую 1/2 набор макроэлементов, 15 г/л сахарозы, 4.0 мг/л БАП и 0.5 мг/л ГК₃. Посредством постоянного мониторинга и селекции первичного каллуса и кончиков корней были выделены две морфогенные линии. Линия PgR через четыре месяца после переноса на среду, содержащую 1.0 мг/л индолил-3-масляной кислоты стала образовывать корни. Линия PgG через три месяца после начала формирования почек и листьев была перенесена на среду с фитогормонами (0.5 мг/л БАП и 2.0 мг/л НУК). На момент исследования линии установили стабильные фенотипы, имея сезонные изменения в приросте биомассы, в линии PgR развивались корни, в линии PgG формировались листья.

Условия культивирования. Для культивирования клеточных линий использовали модифици-

рованную МС-среду [21]. Модификация МС-среды заключалась в уменьшении содержания нитрата аммония до 400 мг/л, количества микро- и макроэлементов — в два раза и дополнительном введении в ее состав следующих компонентов: тиамина гидрохлорида (0.2 мг/л), пиридоксина гидрохлорида (0.5 мг/л), никотиновой кислоты (0.5 мг/л), мезоинозита (100 мг/л), пептона (100 мг/л), сахарозы (25–30 г/л), агара (6.0 г/л), а также фитогормонов (4.0 мг/л БАП, 1.0 мг/л ИМК, 2.0 мг/л НУК), pH 5.6–5.8 (до автоклавирования). Каллусные культуры (PgR, PgG) выращивали в колбах объемом 100 мл (объем МС-среды 30 мл) в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$, для PgG использовали 16-часовой фотопериод (освещенность 2500 лк), относительная влажность воздуха 50–70%. Период между пересадками каллусных культур составлял 30 сут. Для пересадки использовали фрагменты каллуса размером $0.8 \pm 0.1\text{ см}^3$.

Гистологический анализ. Для гистологического исследования фрагменты морфогенных культур величиной не более 0.5 см^3 фиксировали смесью 4% формальдегида (объем 7 мл), этанола 70% (объем 36 мл) и ледяной уксусной кислоты 7 мл (фиксатор ФСУ) путем вакуумной инфильтрации, обезжизивали, заливали парафином. Срезы толщиной 5–10 мкм изготавливали с помощью ротационного микротомы HM 340E (Microm, Thermo Scientific, Великобритания). Окраску срезов проводили по Жинкиной и Вороновой [22]. В качестве красителя использовали альциановый синий и гематоксилин. После гистохимической окраски препараты изучали на световом микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Растворители и стандартные образцы. Ацетонитрил и метанол были получены от Merck (Германия). Муравьиная кислота была приобретена у компании Sigma-Aldrich (Германия). Деионизированную воду очищали с помощью системы очистки воды Milli-Q Simplicity (Millipore, Франция). Стандартные образцы индивидуальных гинзенозидов (G-Rg1, G-Re, G-Rf, NG R2, G-Rb1, G-Rg2, G-Rc, G-Ro, G-Rb2, G-F1, G-Rd, G-F2) для качественного анализа были предоставлены лабораторией органического синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук. Стандартные образцы G-Rg3 и G-Rh1 (Sigma-Aldrich, КНР) использовались для полуколичественной оценки содержания индивидуальных три-терпеновых гликозидов в исследуемых образцах.

Подготовка проб для анализа тритерпеновых гликозидов. Для анализа использовали морфогенные линии на 20 сутки от начала пассажа с трехкратной повторностью и среднюю часть трех разных корней растений, выращенных на планта-

ции. Лиофильно высушенный измельченный растительный материал (100 мг) экстрагировали в 2 мл 80% (по объему) водного метилового спирта в течение 30 мин с использованием ультразвука (Ультразвуковая ванна “Сапфир-28,0 ТТЦ”, Россия) и выдерживали в течение 20 ч при комнатной температуре без доступа света. Затем экстракты центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин (Эппендорф, Германия), собирали супернатант и остаток повторно экстрагировали тем же способом. Супернатанты объединяли, фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, Bedford, США) и использовали для анализа.

Аналитическая хроматография и масс-спектрометрия. Профилирование тритерпеновых гликозидов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (ОФ-ВЭЖХ-ВРМС(/МС)) с использованием хромато-масс-спектрометра Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония), оснащенного жидкостным хроматографом высокого давления LC-20A Prominence и гибридным времяпролетным масс-спектрометром с ионной ловушкой. Подвижная фаза состояла из растворов муравьиной кислоты (0.1% по объему) в деионизированной воде (А) и ацетонитриле (Б). Разделение компонентов экстрактов проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм, Agilent, США), уравновешенной в 10% элюента Б и термостатированной при 30°C. Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0.2 мл/мин по следующей схеме: от 10 до 50% Б за 50 мин, затем от 50 до 95% Б за 10 мин, и 95% Б до 75 мин. Масс-спектрометрические данные получали в режиме ионизации электрораспылением и одновременной регистрации отрицательных и положительных ионов с разрешением 12000. Диапазон регистрируемых значений m/z (отношение массы к заряду) составил 400–1500, давление газа осушителя (N_2) – 195 кПа, поток газа распылителя (N_2) – 1.5 л/мин, потенциал ионного источника менялся от –3.8 кВ до 4.5 кВ. Температура интерфейса составляла 200°C. Тандемную масс-спектрометрию проводили с использованием масс-спектрометра низкого разрешения Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, GmbH, Германия), оснащенного ионной ловушкой, в режиме ионизации электрораспылением и регистрации отрицательных ионов. Сигнал детектора записывали в автоматическом режиме при постоянном напряжении фрагментации 1.4 В.

Полуколичественную оценку содержания индивидуальных гинзенозидов рассчитывали, используя метод внешней калибровки против стандартных образцов гинзенозидов двух эталонных

образцов G-Rg3 и G-Rh1 с концентрацией 100 мкг/мл. Анализ данных и построение диаграмм осуществлялось с помощью пакета программ Microsoft Excel 2016. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с использованием апостериорного критерия защищенной наименьшей значимой разницы (PLSD) Фишера, уровень статистической значимости принимали за $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическая и гистологическая характеристика линий PgR и PgG. В течение 6 лет культивирования клеточные линии женьшеня не меняли свой фенотип, характеризуясь только сезонными изменениями в приросте биомассы. В ризогенной линии стабильно формировались корни с участками разрастания недифференцированной массы клеток; из сформированных почек геммогенной линии вырастали листья, периодически формировались соцветия (рис. 1а, 1б).

Линия PgR. Клеточная линия регенерировала корни, не отличающиеся по своей морфологии от трансформированных корней *P. ginseng*, образующихся при культивации на жидких средах [23]. Корни имели светлый оранжево-коричневый цвет и практически не образовывали латеральных корней второго и третьего порядка (рис. 1а). Интересно отметить, что образование корней происходило из апексов более старых корней, на которых формировались утолщения. Это можно объяснить наличием активной меристемы апекса (рис. 1в). Молодые корни имели более светлую окраску. В некоторых случаях начало формирования апекса боковых корней происходило на границе между эндодермой и центральным цилиндром корня, как и у боковых корней интактных растений женьшеня. Внутри корешков находится проводящая ткань (рис. 1д). Основная часть клеток коры корня вакуолизируется и образует межклетники, в которых происходит разрастание каллусной ткани.

Линия PgG. Клеточная линия регенерировала почки, из которых развивались листья с хорошо сформированными черешком и листовой пластинкой (рис. 1б). Размер листьев не превышал 2–3 см. Развитие почек происходило аналогично развитию почек нативного растения первого года. Субэпидермальные клетки меристематической зоны, претерпевая несколько периклинальных и антиклинальных делений, формировали меристематический бугорок на поверхности твердого каллуса. В дальнейшем на нем закладывались листовые примордии (рис. 1г) и апекс будущего побега, образующие почку (рис. 1г). Таким образом, в линии наблюдался постоянный процесс возобновляемого геммогенеза (формирования почек).

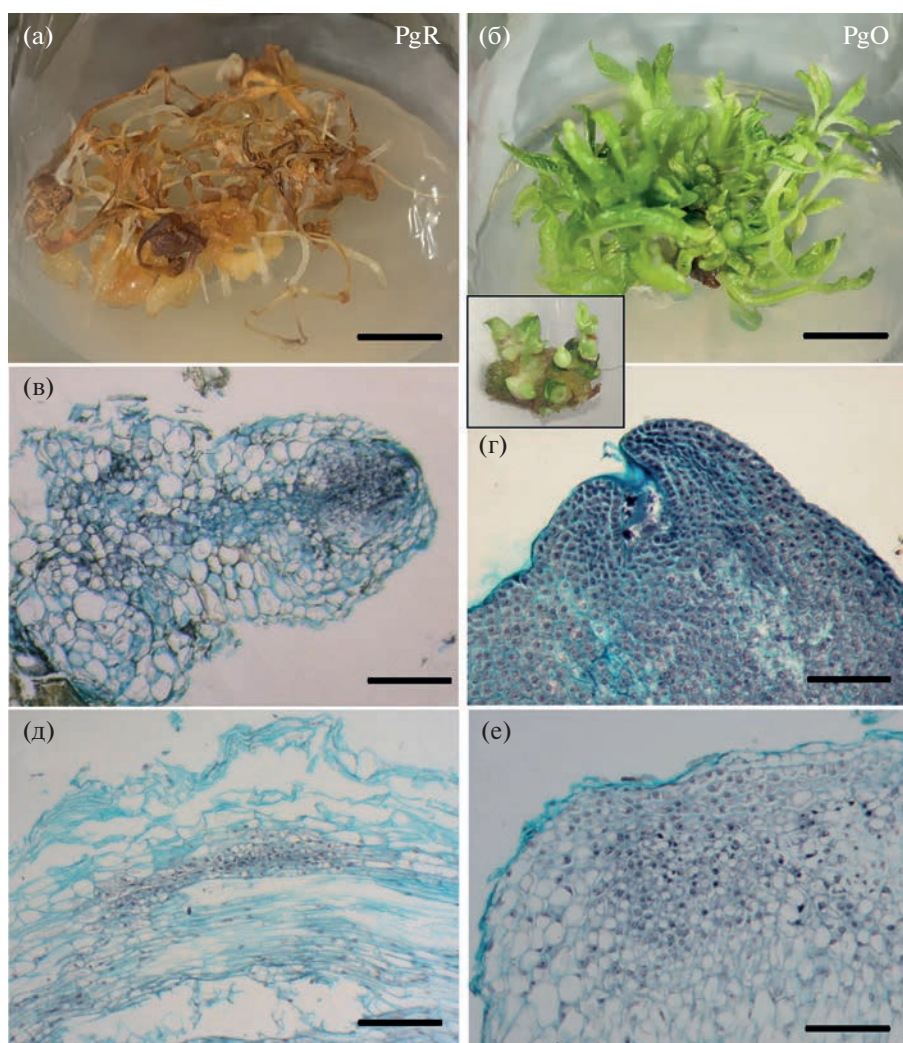


Рис. 1. Морфогенные клеточные линии PgR и PgG *Panax ginseng*: а – внешний вид ризогенной линии PgR, масштаб 1 см; б – внешний вид геммогенной линии PgG, масштаб 1 см; в – гистологический срез апекса корня линии PgR, масштаб 500 мкм; г – гистологический срез почки с примордиями листьев линии PgG, масштаб 500 мкм; д – продольный срез корня с проводящим пучком и меристемными клетками линии PgR, масштаб 500 мкм; е – продольный срез основания каллуса PgG с меристематическими клетками.

Периодически наблюдали формирование цветочных (генеративных) почек и соцветий. С течением времени листья заканчивали вегетацию и отмирали с поверхности основного плотного каллуса, на котором формировались новые почки. Развития корней в линии не происходило. Основание каллуса было представлено плотной тканью, большая часть которой состояла из меристематических клеток, расположенных в субэпидермальном слое (зоны роста будущих почек и листьев) (рис. 1е).

Идентификация гинзенозидов, обнаруженных в морфогенных клеточных линиях женьшеня и нативных плантационных корнях. Более 60 тритерпеновых гликозидов были детектированы и охарактеризованы с использованием ВЭЖХ-МС(/МС) в исследуемых экстрактах нативного корня и морфогенных линий *P. ginseng*. ВР-ВЭЖХ-МС хрома-

тографические профили по полному ионному току показаны на рис. 2.

Первоначально было изучено хроматографическое и масс-спектрометрическое поведение 14 стандартных образцов, из которых 12 (G-Rg1, G-Re, G-Rf, NG-R2, G-Rb1, G-Rg2, G-Rc, G-Ro, G-Rb2, G-F1, G-Rd, G-F2) были ранее выделены и охарактеризованы в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук [24, 25]. Еще два соответствовали двум эталонным стандартам G-Rg3 и G-Rh1 компании Sigma-Aldrich. На этом этапе были оптимизированы параметры ВЭЖХ метода, такие как температура термостата аналитической колонки, состав подвижной фазы и профиль гра-

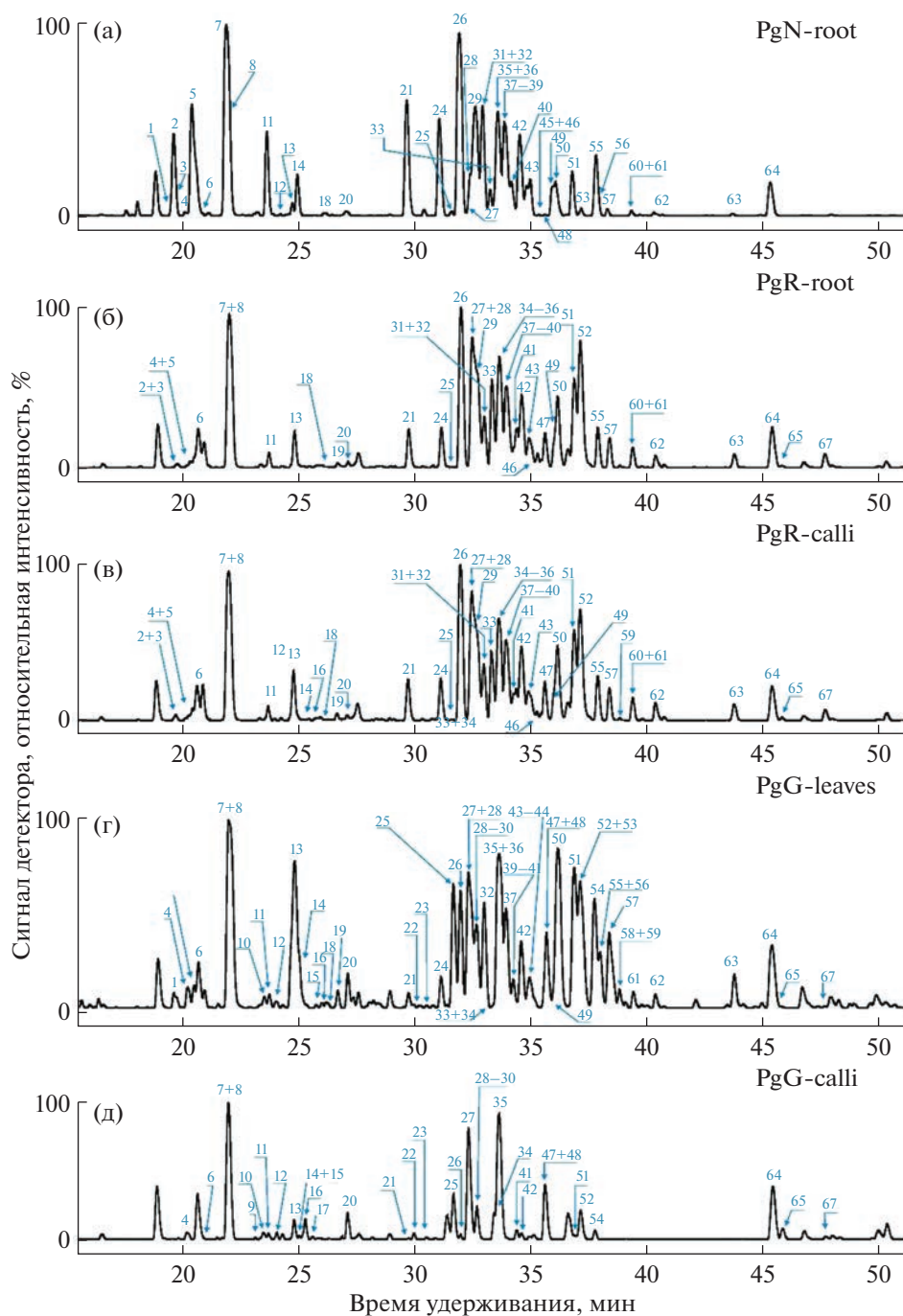


Рис. 2. Хроматографические профили ВЭЖХ-МС анализа (полный ионный ток, регистрация отрицательных ионов) неочищенных метанольных экстрактов из нативных корней и морфогенных линий *Panax ginseng*: а — нативный корень (PgN-root); б — образец PgR-root; в — образец PgR-calli; г — образец PgG-leaves; д — образец PgG-calli. Нумерация пиков на хроматограмме соответствует номерам веществ из табл. 1 (Дополнительные материалы).

диентного элюирования. Муравьиная кислота, используемая как добавка к подвижной фазе, не только улучшила разрешение и форму хроматографических пиков, но также усилила ионизацию, вызвала образование ионов-аддуктов, что облегчило обнаружение и подтверждение молекулярного иона. Для идентификации компонен-

тов экстрактов было решено использовать масс-спектрометрию высокого разрешения (с ошибкой определения брутто-формулы не более 8 мДа) с одновременной регистрацией отрицательных и положительных ионов (хромато-масс-спектрометр Shimadzu LCMS-IT-TOF). В режиме полного сканирования гинзенозиды определялись как депро-

Таблица 1. Соотношение суммарного содержания гинзенозидов типов протопанаксациола (PPD) и протопанаксатриола (PPT) (PPD/PPT) и соотношение суммарного содержания нейтральных гинзенозидов к малонилированным гинзенозидам (PPD/m-PPD; PPT/m-PPT) соответствующих структурных типов

Образец	Соотношения содержания сумм гинзенозидов		
	PPD/PPT*	PPD/m-PPD*	PPT/m-PPT*
PgNroot (нативные корни)	0.71	1.46	10.03
PgR-root (корни <i>in vitro</i>)	1.07	1.10	22.16
PgR-calli (базальный каллус ризогенной линии)	1.12	1.30	16.71
PgG-leaves (листья <i>in vitro</i>)	0.66	2.17	9.93
PgG-calli (базальный каллус геммогенной линии)	0.04	0.18	29.48

Примечание. Звездочками (*) обозначено отношение сумм определенных типов гинзенозидов.

тонируемые ионы $[M-H]^-$ и ионы-аддукты с муравьиной кислотой $[M + HCOO]^-$ (всегда для нейтральных гинзенозидов). Это часто подтверждалось обнаружением натриевых аддуктов $[M + Na]^+$ (табл. 1, Дополнительные материалы), причем соотношения интенсивностей молекулярных ионов и ионов-аддуктов были индивидуальны для каждого компонента и сохранялись от анализа к анализу. Отрицательный режим сканирования оказался более чувствительным, тогда как МС/МС спектры показали больше информации о фрагментации ионов предшественников состава $[M-H]^-$ и/или $[M + HCOO]^-$. Для получения МС/МС спектров в настоящем исследовании использовали масс-спектрометрию низкого разрешения (масс-спектрометр низкого разрешения Bruker HCT ultra, функционирующий в режиме регистрации отрицательных ионов и автоматическом выборе ионов-прекурсоров), благодаря его высокой чувствительности и хорошо различимым масс-спектрам в этом режиме. Характерный путь фрагментации стандартных образцов был полностью изучен и продемонстрировал картину, как правило, соответствующую последовательной потере гликозидных остатков до образования ионов сапогенина/агликона (Agl) $[Agl-H]^-$. Условия фрагментации были оптимизированы таким образом, чтобы получить сигнал ионов сапогенина для каждого компонента за один цикл анализа. Соответственно различные группы гинзенозидов хорошо дифференцировались и характеризовались при помощи МС/МС спектров. Основные группы гинзенозидов, обнаруженных в экстрактах — производные протопанаксациола (PPD-тип), протопанаксатриола (PPT-тип) и олеаноловой кислоты (Ole-тип). При МС/МС-фрагментации эти гликозиды продуцировали ионы сапогенинов: $[PPD-H]^-$ с m/z 459 ($C_{30}H_{51}O_3$), $[PPT-H]^-$ с m/z 475 ($C_{30}H_{51}O_4$) и $[Ole-H]^-$ с m/z 455 ($C_{30}H_{47}O_3$) соответственно (табл. 1, Дополнительные материалы). Также сахарные цепочки легко идентифицировались путем определения моле-

кулярной массы последовательных нейтральных потерь от ионов $[M-H]^-$ (и/или $[M + HCOO]^-$) до ионов сапогенина $[Agl-H]^-$, обычно это 162, 146, 132 и 176 Да, что в основном соответствует элиминированию дегидрированных остатков глюкозы (Glc), рамнозы (Rha), пентозы (Pent), арабинопиранозы (Arap), арабинофуранозы (Araf) или ксиллозы (Xyl) и глюкуроновой кислоты (GlcA), соответственно (рис. 1–4, Дополнительные материалы).

В исследуемых объектах были обнаружены 2 ацетилированных (пики 45 и 54) и 18 малонилированных производных гликозидов (пики 11, 13, 14, 29, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 46, 49, 51, 53, 56, 57, 59 и 60), причем три из них идентифицированы как дважды малонилированные (табл. 1, Дополнительные материалы). Характерной особенностью малонилированных производных, как и всех кислых гинзенозидов, можно считать отсутствие в отрицательном спектре полного сканирования сигнала аддуктов с муравьиной кислотой и наличие сигналов депротонированных ионов в паре с ионами фрагментами состава $[M-H]^-$, образованными благодаря нейтральной потере CO_2 [4]. Причем интенсивность ионов $[M-H-CO_2]^-$ обычно была в 2 и более раз выше, чем интенсивность ионов $[M-H]^-$, что обусловлено нестабильностью молекулы. Также обычно присутствовал сигнал и натриевых аддуктов $[M + Na]^+$. Следует отметить, что некоторые малонил-гликозиды присутствовали в исследуемых экстрактах в виде нескольких изомерных форм, которые вероятно различаются положением малонильного остатка [26–29].

Необходимо отметить, что существует множество изомерных форм гинзенозидов. В частности, в изученных образцах были выявлены несколько гликозидов, которые имели близкие (в пределах ошибки в 8 мДа) значения m/z и идентичную молекулярную формулу. Только с помощью анализа МС/МС для этих гликозидов удалось выявить различия в структуре и провести их разграничение на основании гипотетического строения агликонов (несколько примеров идентификации

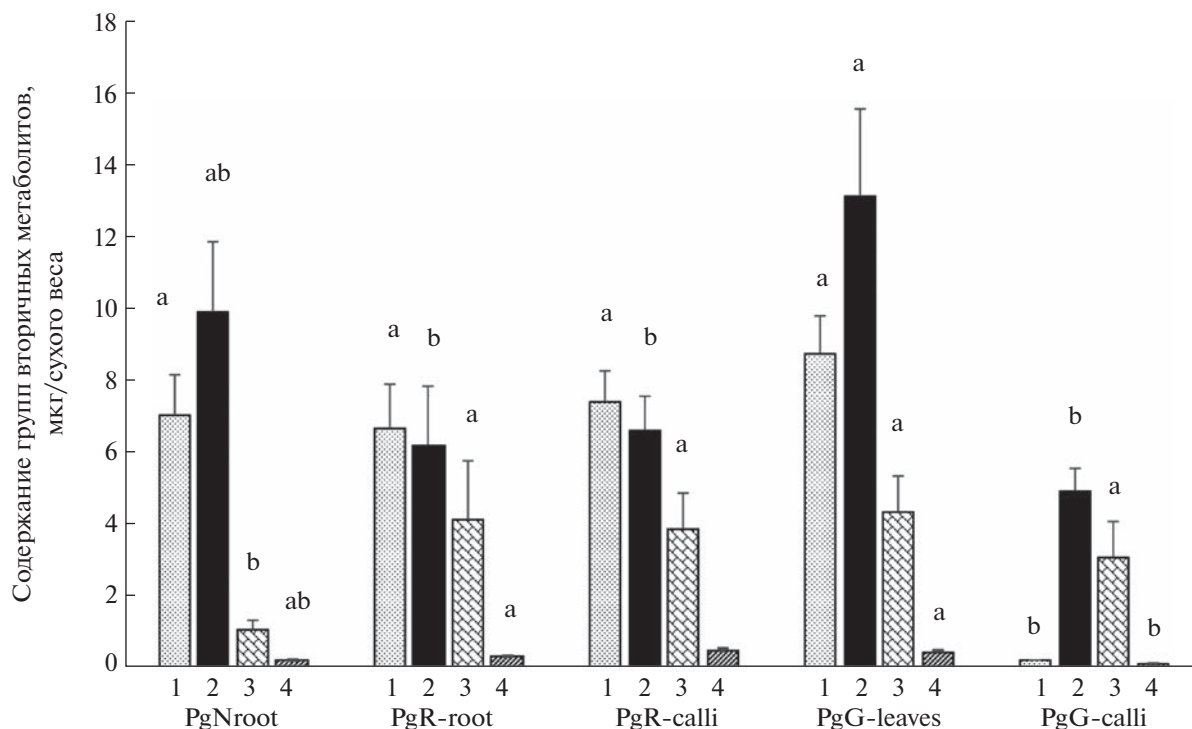


Рис. 3. Распределение разных типов гинзенозидов в пяти исследуемых образцах *Panax ginseng*. Разными буквами обозначены достоверные отличия значений по каждой группе гинзенозидов. 1 — суммарное содержание протопанаксодиолов (PPD); 2 — суммарное содержание протопанаксатриолов (PPT); 3 — суммарное содержание производных окотиллолов (Oct); 4 — суммарное содержание производных олеаноловой кислоты (Ole).

гинзенозидов с одинаковой молекулярной формулой представлены рис. 2 и 3, Дополнительные материалы). Примечательно, что некоторые три-терпеновые гликозиды типа окотиллола (Oct-тип) также были обнаружены и идентифицированы в исследованных образцах. МС/МС спектры соединений № 6, 10 и 15 содержали сигнал иона с m/z 491 ($C_{30}H_{51}O_5$), соответствующий депротонированному агликону окотиллолового типа [Oct-H]⁻ [2, 27]. Также восемь производных олеаноловой кислоты были обнаружены в исследуемых экстрактах (пики 34, 35, 41, 47, 52, 64, 65, 67). В режиме полного сканирования гинзенозиды типа Ole обнаруживали интенсивные сигналы депротонированных ионов [M-H]⁻ и натриевых аддуктов [M + Na]⁺ (некоторые примеры идентификации гинзенозидов производных олеаноловой кислоты представлены на рис. 4, Дополнительные материалы).

В результате проделанной работы в неочищенных экстрактах суммарных образцов нативных корней и морфогенных линий *P. ginseng* были идентифицированы 66 гинзенозидов, из которых 13 компонентов (пики № 7 (G-Rg1), 8 (G-Re), 21 (G-Rf), 24 (NG-R2), 26 (G-Rb1), 28 (G-Rg2), 31 (G-Rh1), 32 (G-Rc), 35 (G-Ro), 37 (G-Rb2), 48 (G-F1), 50 (G-Rd) и 63 (G-F2)) были идентифицированы путем сравнения их хроматографического и масс-спектрометрического поведения с

эталонными стандартами, а остальные соединения были определены путем сравнения эмпирических молекулярных формул, а также информации о фрагментации и последовательности их удерживания на обращенной фазе с данными из литературы [2, 4, 5, 26–33]. Все хроматографические и масс-спектрометрические данные, использованные для идентификации, собраны в табл. 1 (Дополнительные материалы).

Анализ распределения гинзенозидов, обнаруженных в морфогенных клеточных линиях женьшеня и нативных плантационных корней. Для анализа распределения гинзенозидов в морфогенных клеточных линиях, материал был разделен на ткани: базальные — без признаков дифференциации на ткани, органогенные — формирующие определенные органы. Ризогенная линия PgR была разделена на две части: корни (PgR-root) и утолщенный базальный каллус (PgR-calli). Геммогенная линия PgG (рис. 1а, 1б) также была разделена на листья (PgG-leaves) и базальный каллус, на котором формировались почки, из которых развивались листья (PgG-calli). На основе полученной ранее идентификации был проанализирован качественный состав разделенных образцов в сравнении с образцом, полученным из нативных корней.

Таким образом, в плантационном корне и культивированных *in vitro* тканях (корни (PgR-root) и их

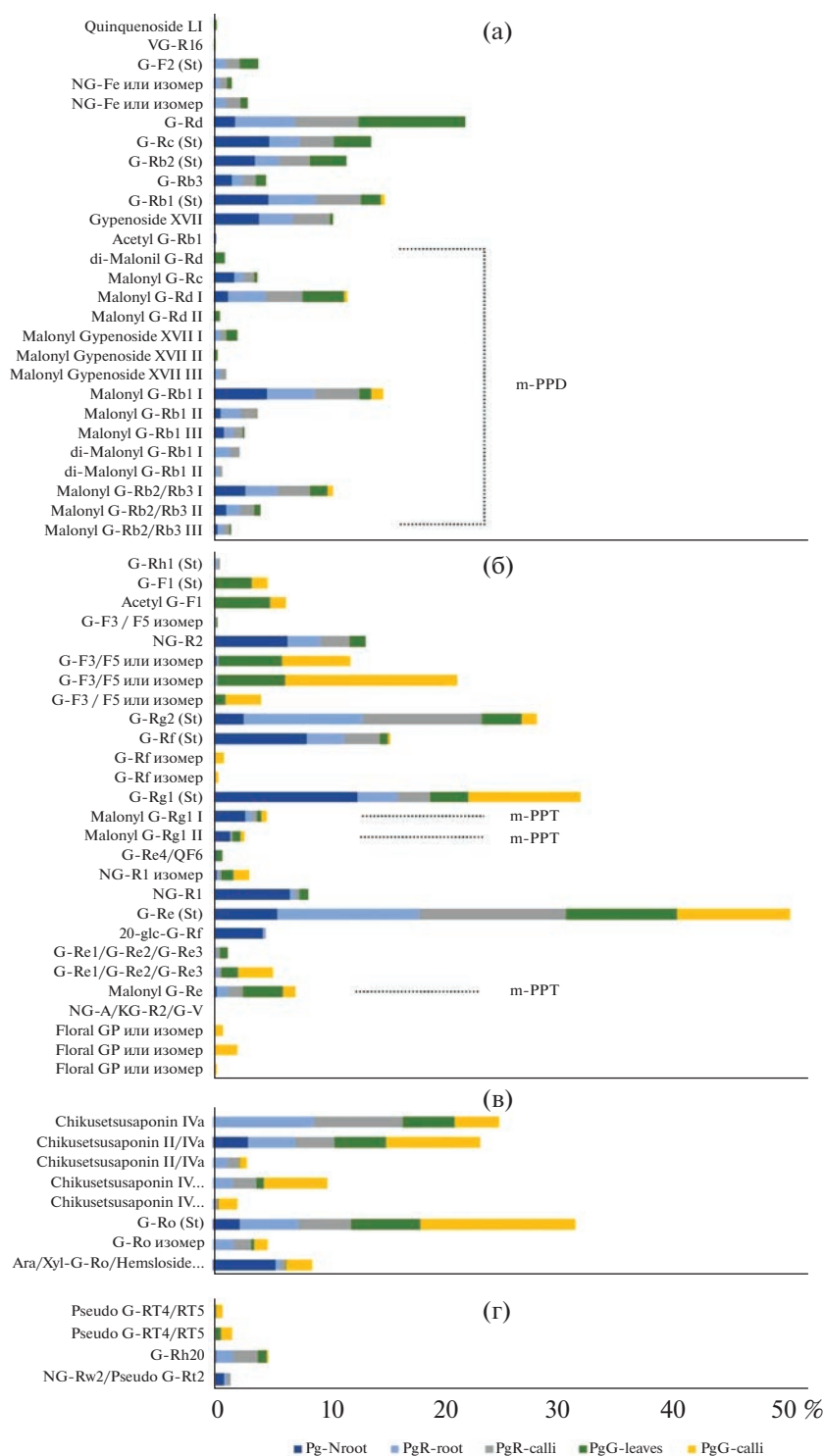


Рис. 4. Соотношение 66 определенных гинзенозидов в образцах морфогенных линий и нативных плантационных корней, % от сухого веса веществ: а – протопанаксациолы (PPD); б – протопанаксатриолы (PPT); в – производные окотиллола (Ost); г – производные олеаноловой кислоты (Ole).

базальный каллус (PgR-calli); листья (PgG-leaves) и их базальный каллус, из которого формировались почки и листья (PgG-calli)) было идентифицировано 66 гинзенозидов (рис. 4 и табл. 1, Дополнительные материалы). Наибольшее разнообра-

зие в составе гинзенозидов было обнаружено в листьях геммогенной линии – 57 соединений. Качественный состав плантационных корней и корней в культуре ткани практически совпадал и был представлен 47 соединениями. Базальный

каллус PgR-calli содержал 50 гинзенозидов, представленных в плантационных и культивируемых *in vitro* корнях, при этом корни *in vitro* содержали более разнообразные формы Ole-типа соединений (пик № 41, 47, 52, 65, 67), не обнаруженных в плантационных корнях (рис. 4). Самым бедным по разнообразию гинзенозидов являлся морфогенный базальный каллус, из которого формировались листья (рис. 3, 4). В нем было найдено всего 35 гинзенозидов. При этом он содержал достаточно редкие для нативных корней гинзенозиды олеанолового и окатиолового типов (рис. 4). Несколько соединений были обнаружены исключительно в этом типе каллуса.

Для изучения распределения индивидуальных гинзенозидов в нативных корнях и различных тканях и органах морфогенных клеточных линий был использован полуколичественный анализ с применением метода внешней калибровки относительно стандартных образцов гинзенозидов G-Rg3 и G-Rh1. Результаты представлены на рис. 3, 4.

Суммарное содержание гинзенозидов в плантационном 6-летнем корне и клеточных линиях составляло: в интактных корнях — 18.13 ± 2.72 мг/г сухого веса; в корнях ризогенной клеточной линии — 17.24 ± 3.45 мг/г сухого веса; в базальном каллусе ризогенной клеточной линии 18.29 ± 2.74 мг/г сухого веса; в листьях геммогенной линии — достигало достоверно максимальных значений 26.65 ± 4.78 мг/г сухого веса; в базальном каллусе геммогенной клеточной линии было достоверно минимальным — 8.26 ± 1.07 мг/г сухого веса (рис. 3). Кроме общего содержания гинзенозидов, было проанализировано соотношение типов PPD и PPT (PPD/PPT) и соотношение нейтральных гинзенозидов к малонил-гинзенозидам (табл. 1). Установлено, что соотношение PPD-типа и PPT-типа гинзенозидов было близко к единице, что отражало примерно равное количество данных веществ во всех образцах, за исключением инициального каллуса, формирующего листья (PgG-calli). В этом образце (PgG-calli) производные протопанаксадиола практически отсутствовали и были представлены только 4 гинзенозидами (рис. 4), при этом 3 из них находились в малонилированной форме (m-PPD). Интересен и тот факт, что содержание малонил-эфиров гликозидов протопанаксадиола было одинаково с нейтральными формами этих соединений, в то время как малонилированные производные протопанаксатриола встречались в существенно меньшем количестве (рис. 4).

Несмотря на то, что качественное разнообразие гинзенозидов в клетках базального геммогенного каллуса листьев PgG-calli было беднее, чем в других образцах, ряд веществ (№ 7, 8, 27, 35) (табл. 1, Дополнительные материалы) были обнаружены в большем количестве по сравнению с остальными

гинзенозидами именно в этих клетках (15.05; 13.5; 9.84; 9.85% от сухого веса) соответственно (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Имеются работы, где используются методы, комбинированные с ВЭЖХ-МС для определения разных видов женьшеня, органов и тканей растений по составу гинзенозидов [4, 27]. При этом показано, что концентрации гинзенозидов резко меняются в ответ на изменение внешних условий: смена сезона, освещения, полива, засоление почв, добавление удобрений или стимуляторов роста [34, 35]. Считается, что физиологическая роль этих многоцелевых молекул в растениях сводится в основном к защитной функции от патогенов. Однако, новые данные по динамике изменений соотношения и распределения этих веществ в процессе роста растений у разных видов этого рода указывают на более сложную картину синтеза и физиологических функций этих веществ [36]. Для других видов двудольных растений показано, что простые и сложные тритерпеноиды влияют на фундаментальные клеточные процессы (пролиферация клеток, изменения направления дифференциации, пути передачи сигналов), но молекулярные мишени, на которые распространяется действие этих соединений, пока не идентифицированы [37].

Первоначально мы ожидали, что состав гинзенозидов базальных каллусов, из которых формировались органы (корни и почки), будет одинаков, так как в этих тканях протекают начальные стадии морфогенеза (рис. 1). При этом соотношение клеточных типов в тканях различного возраста и происхождения значительно отличается. В базальных тканях ризогенной клеточной линии (PgR-calli) большое количество паренхимных запасающих клеток, количество же меристематических клеток было относительно небольшим (рис. 1в, 1д). Превалирующими оказались паренхимные клетки. В то же время количество меристематических клеток в базальном каллусе геммогенной линии (PgG-calli) достигало $82 \pm 4\%$. В эмбриональных тканях растений вторичные метаболиты обычно не синтезируются, т.к. вся энергия меристематических клеток тратится на процессы регуляции морфогенеза и пролиферацию [38]. Это подтверждается и нашими данными о том, что общее количество гинзенозидов в этих тканях снижалось по сравнению с другими образцами почти в 2 раза, вероятно, за счет количества протопанаксадиола (рис. 3). Максимальное содержание гинзенозидов наблюдалось в листьях геммогенной линии (рис. 3). В литературе показано, что содержание гинзенозидов в листьях и корневых волосках нативных растений *P. ginseng* выше, а в стебле и других частях ниже, по сравнению с центральной частью основных корней [39].

У растений *P. notoginseng* тип 20(S)-протопанаксатриола был распространен преимущественно в подземных частях, тогда как 20(S)-протопанаксациол — в надземных частях [40]. Для американского женьшеня *P. quinquefolium* [8] показано такое же соотношение основных гинзенозидов в надземных частях и завязях растений, как в листьях *in vitro*, представленных в нашей работе. Напротив, в культуре ткани линии PgR-root и PgR-calli было увеличение протопанаксатриола Re в 2 раза, по сравнению с нативным корнем.

Примечательно, что, несмотря на бедный по разнообразию состав гинзенозидов в базальной части геммогенного каллуса, количество редких гинзенозидов олеанолового типа (Ro и изомеров Chikusetsusaponin IVa) значительно превышало таковое не только в нативных корнях, но и в листьях. В американском женьшене было показано достоверное увеличение гинзенозида Ro в цветочных почках [8]. Возможно, у женьшеня в процессе развития инициальных тканей почек в каллусе и на начальных стадиях развития тканей завязей у интактных растений вырабатываются одинаковые вещества, которые относятся к Ole-типу гинзенозидов. В этом же типе каллуса PgG-calli наблюдалось максимальное количество изомеров G-F3 (до 29% сухого веса всех гинзенозидов).

Необходимо отметить, что морфогенные клеточные линии повторяют не только паттерн качественного состава гинзенозидов, по сравнению с отдельными частями нативных корней и листьев, но и увеличивают их разнообразие и количество, часто за счет накопления промежуточных соединений. При этом, несмотря на наличие небольшого разнообразия редких гинзенозидов во всех исследуемых образцах, значительное увеличение по количеству отдельных типов гинзенозидов протопанаксатриолов и олеаноловых наблюдалось в базальных каллусах PgR-calli и PgG-calli. Гистологический анализ показал, что базальные каллусы двух линий имеют в своем составе много меристематической ткани, которой необходимо поддерживать высокое число клеточных делений, что замедляет накопление конечных продуктов. Накопление определенных типов гинзенозидов в делящихся видах ткани косвенно указывает на пролиферативное действие данных веществ, т.к. они практически отсутствуют в зрелых дифференцированных тканях.

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 2326-00213.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлев Ю.Н., Томских А.А., Горпенченко Т.Ю. История и перспективы генетических исследований женьшеня на Дальнем Востоке России // Вестник ДВО РАН. 2022. № 4. С. 101. https://doi.org/10.37102/0869-7698_2022_224_04_9
2. Chen W., Balan P., Popovich B.G. Ginsenosides analysis of New Zealand-grown forest *Panax ginseng* by LC-QTOF-MS/MS // J. Ginseng Res. 2020. V. 44. P. 552. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.04.007>
3. Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Z. Phytochemical analysis of *Panax* species: a review // J. Ginseng Res. 2021. V. 45. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.009>
4. Du Z., Li J., Zhang X., Pei J., Huang L. An integrated LC-MS-based strategy for the quality assessment and discrimination of three *Panax* species // Molecules. 2018. V. 23. P. 2988. <https://doi.org/10.3390/molecules23112988>
5. Li F., Lv C., Li Q., Wang J., Song D., Liu P., Zhang D., Lu J. Chemical and bioactive comparison of flowers of *Panax ginseng* Meyer, *Panax quinquefolius* L., and *Panax notoginseng* Burk // J. Ginseng Res. 2017. V. 41. P. 487. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.08.008>
6. Lee J.W., Choi B.-R., Kim Y.-C., Choi D.J., Lee Y.-S., Kim G.-S., Baek N.-I., Kim S.-Y., Lee D.Y. Comprehensive profiling and quantification of ginsenosides in the root, stem, leaf, and berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS // Molecules. 2017. V. 22 P. 2147. <https://doi.org/10.3390/molecules22122147>
7. Lee J., Han H., Yuan X., Park E., Lee J., Kim J.H. A rapid, simultaneous and quantitative analysis of 26 ginsenosides in white and red *Panax ginseng* using LC-MS/MS // Appl. Biol. Chem. 2021. V. 64:13. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00588-w>
8. Di P., Yan Y., Wang P., Yan M., Wang Y.-P., Huang L.-Q. Integrative SMRT sequencing and ginsenoside profiling analysis provide insights into the biosynthesis of ginsenoside in *Panax quinquefolium* // Chin. J. Nat. Med. 2022. V. 20. P. 614. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(22\)60198-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(22)60198-5)
9. Gantait S., Mitra M., Chen J.-T. Biotechnological interventions for ginsenosides production // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 538. <https://doi.org/10.3390/biom10040538>
10. Xu F., Valappil A.K., Mathiyalagan R., Tran T.N.A., Ramadhan Z.M., Awais M., Yang D.C. *In vitro* cultivation and ginsenosides accumulation in *Panax ginseng*: a review // Plants. 2023. V. 12. P. 3165. <https://doi.org/10.3390/plants12173165>
11. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation

- and scaling-up to bioreactors // Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology / Ed. Paek K.Y., Murthy H., Zhong J.J. Dordrecht: Springer-Verlag. 2014. P. 563.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23
12. Atanasov A.G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. P. 1582.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
 13. Nakonechnaya O.V., Gafitskaya I.V., Grigorchuk V.P., Gorpenchenko T.Y., Bezdelev A.B., Zhuravlev Y.N. Polyphenol composition of *Dracocephalum charkeviczii* Prob. plants in *in situ* and *in vitro* conditions // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69:27.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722010149>
 14. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg 1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 649.
<https://doi.org/10.1134/S102144371705003X>
 15. Glagoleva E.S., Konstantinova S.V., Kochkin D.V., Ossipov V., Titova M.V., Popova E.V., Nosov A.M., Paek K.Y. Predominance of oleanane-type ginsenoside R0 and malonyl esters of protopanaxadiol-type ginsenosides in the 20-year-old suspension cell culture of *Panax japonicus* C.A. Meyer // Ind. Crops Prod. 2022. V. 177 P. 552114417
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114417>
 16. Wu J., Zhong J.-J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects // J. Biotechnol. 1999. V. 68. P. 89.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(98\)00195-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(98)00195-3)
 17. Kochkin D.V., Glagoleva E.S., Galishev B.A., Spiridovich E.V., Nosov A.M., Reshetnikov V.N. Analysis of ginsenosides in the roots of *Panax ginseng* introduced in the central botanical garden of NAS of Belarus // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus. 2018. V. 62. P. 447.
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-4-447-454>
 18. Балеев Д.Н., Осипов В.И., Савин П.С., Байкова Ю.П., Сидельников Н.И. Сравнительный анализ состава и содержания гинзенозидов в каллусной культуре клеток и корне женьшеня обыкновенного, *Panax ginseng* // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 2. С. 57.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822020028>
 19. Song X., Wu H., Piao X., Yin Z., Yin Ch. Microbial transformation of ginsenosides extracted from *Panax ginseng* adventitious roots in an airlift bioreactor // Electron. J. Biotechnol. 2017. V. 26. P. 20.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.12.005>
 20. Журавлев Ю.Н., Гетманова Е.С., Музарок Т.И., Булгаков В.П. Способ микроразмножения женьшеня. Патент SU1824114A1, 1993.
 21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 22. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // Ботанический журнал. 2000. Т. 85. С. 168.
 23. Gorpenchenko T.Y., Kiselev K.V., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Bragina E.A., Khodakovskaya M.V., Koren O.G., Batygina T.B., Zhuravlev Y.N. The *Agrobacterium rhizogenes* rolC-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses // Planta. 2006. V. 223. P. 457.
<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0102-2>
 24. Уварова Н.И., Маханьков В.В., Малиновская Г.В., Самошина Н.Ф., Атопкина Л.Н., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Анисимов М.М., Еляков Г.Б. Химическая характеристика, сравнительное количественное определение и биологическая активность тритерпеновых гликозидов из дикого и плантационного женьшеня *Panax ginseng* С.А. Мейер, произрастающих в Приморском крае // Химико-фармацевтический журнал. 2000. Т. 34. С. 19.
 25. Маханьков В.В., Бурундукова О.Л., Музарок Т.И., Уварова Н.И., Журавлев Ю.Н. Содержание гинзенозидов в листьях *Panax ginseng* С.А. Мейер в зависимости от возраста и условий произрастания // Растительные ресурсы. 2007. Т. 3. С. 107.
 26. Chen Y., Zhao Z., Chen H., Yi T., Qin M., Liang Z. Chemical differentiation and quality evaluation of commercial asian and american ginsengs based on a UHPLC-QTOF/MS/MS metabolomics approach // Phytochem. Anal. 2015. V. 26 P. 145.
<https://doi.org/10.1002/pca.2546>
 27. Qiu S., Yang W.Z., Shi X.J., Yao C.L., Yang M., Liu X., Jiang B.-H., Wu W.-Y., Guo D.A. A green protocol for efficient discovery of novel natural compounds: characterization of new ginsenosides from the stems and leaves of *Panax ginseng* as a case study // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 893 P. 65.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.048>
 28. Wang H.P., Zhang Y.B., Yang X.W., Zhao D.Q., Wang Y.P. Rapid characterization of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS and simultaneous determination of 19 ginsenosides by HPLC-ESI-MS // J. Ginseng Res. 2016. V. 40 P. 382.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.12.001>
 29. Minh Duc N., Thoi Nham N., Kasai R., Ito A., Yamasaki K., Tanaka O. Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* HA et GRUSHV. Collected in Central Vietnam. I. // Chem. Pharm. Bull. 1993. V. 41. P. 2010.
<https://doi.org/10.1248/cpb.41.2010>
 30. Dictionary of food compounds additives, flavors, and ingredient / Ed. Sh. Yannai. 2004. A CRC press Company Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 1782 p.
 31. Van Le T.H., Lee G.J., Vu H.K.L., Kwon S.W., Nguyen N.K., Park J.H., Nguyen M.D. Ginseng saponins in different parts of *Panax vietnamensis* // Chem. Pharm. Bull. 2015. V. 63 P. 950.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00369>
 32. Peng M., Zhang T., Ding Y., Yi Y., Yang Y., Le J. Structure-based prediction of CAD response factors 1 of dammarane-type tetracyclic triterpenoid saponins and

- its application to the analysis of saponin contents in raw and processed *Panax notoginseng* // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 36987.
<https://doi.org/10.1039/C6RA03193E>
33. Wang H.-P., Wang Z.-J., Du J., Lin Z.-Z., Zhao C., Zhang R., Yin Q., Fan C.-L., Peng P., Wang Z.-B. Comprehensive identification of ginsenosides in the roots and rhizomes of *Panax ginseng* based on their molecular features-oriented precursor ions selection and targeted MS/MS analysis // Molecules. 2023. V. 28. P. 941.
<https://doi.org/10.3390/molecules28030941>
34. Oh J.Y., Kim Y.J., Jang M.G., Joo S.C., Kwon W.S., Kim S.Y., Jung S.-K., Yang D.C. Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng* // J. Ginseng Res. 2014. V. 38. P. 270.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2014.04.004>
35. Rahimi S., Kim Y.J., Yang D.C. Production of ginseng saponins: elicitation strategy and signal transductions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 6987.
36. Chopra P., Chhillar H., Kim Y.J., Jo I.H., Kim S.T., Gupta R. Phytochemistry of ginsenosides: recent advancements and emerging roles // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2023. V. 63. P. 613.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1952159>
37. Moses T., Papadopoulou K.K., Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2014. V. 40. P. 439.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>
38. Fehér A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 536.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
39. Yang Y., Ju Z., Yang Y., Zhang Y., Yang L., Wang Z. Phytochemical analysis of *Panax* species: a review // J. Ginseng Res. 2021. V. 45. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.009>
40. Yao C.L., Pan H.Q., Wang H., Yao S., Yang W.Z., Hou J.J., Jin Q.H., Wu W.Y., Guo D.A. Global profiling combined with predicted metabolites screening for discovery of natural compounds: characterization of ginsenosides in the leaves of *Panax notoginseng* as a case study // J. Chromatogr. 2018. V. 1538. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.040>

УДК 581.1:615.322:581.192:543.544:58.085

РЕДКОЕ РАСТЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ *Polygala sibirica* L.: ФИТОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И ПОЛУЧЕНИЕ МОРФОГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *in vitro*¹

© 2023 г. Ж. М. Охлопкова^{a, *}, М. П. Разгонова^{b, c}, Е. В. Кучарова^a,
П. С. Егорова^d, К. С. Голохваст^{b, e, f}

^aФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Северо-Восточный федеральный университет имени М. К. Аммосова, Якутск, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

^cФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Дальневосточный федеральный университет, Передовая инженерная школа Институт биотехнологий,
биоинженерии и пищевых систем, Владивосток, Россия

^dИнститут биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, Россия

^eФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Сибирский федеральный научный центр
агробиотехнологий Российской академии наук, Краснообск, Россия

^fФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Национальный исследовательский Томский государственный университет, Национально-образовательный центр
Передовая инженерная школа Агробиотек, Томск, Россия

*e-mail: zhm.okhlopkova@s-vfu.ru

Поступила в редакцию 01.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

Polygala sibirica L. (истод сибирский) — редкий и исчезающий вид растения, который занесен в Красную книгу Республики Саха (Якутия) по категории “3 в” как вид, имеющий узкую экологическую приуроченность к выходам известняковых горных пород. Впервые исследован фитохимический профиль надземной фитомассы истода сибирского, произрастающего в Центральной Якутии, и выполнена индукция культуры *in vitro*. Методами ВЭЖХ-МС/МС и tandemной масс-спектрометрии в метанольных экстрактах надземной фитомассы истода сибирского предположительно идентифицировано 74 соединения, из них 40 соединений идентифицировано впервые в пределах рода *Polygala* L., в том числе 22 полифенольных соединения, включая флавоны (изоформонетин, сирингетин, апигенин 7-О-глюкозид и др.), флавонолы (гербацетин, мирицетин и др.), флаван-3-олы (афзелехин, эпикатехин и др.), флаванолы (гесперитин, эриоцитрин), фенольная кислота и антоцианы. Получена первичная каллусная культура истода сибирского на основе листовых эксплантов интактных растений с изучением динамики роста сырой и сухой биомассы клеток. На основе каллусной ткани инициирован непрямой морфогенез с обильным побегообразованием. Таким образом, заложена основа для последующего размножения редкого растения *P. sibirica* с целью реинтродукции в условиях Якутского ботанического сада.

Ключевые слова: *Polygala sibirica*, ВЭЖХ–МС/МС, каллусная культура, полифенолы, растения Якутии, tandemная масс-спектрометрия, *in vitro* морфогенез

DOI: 10.31857/S0015330323600973, **EDN:** BESXUH

ВВЕДЕНИЕ

Polygala sibirica L. (истод сибирский) — многолетнее травянистое растение рода *Polygala* L. семейства *Polygalaceae* (Истовые). Отмечено распространение в Румынии, Сибири, на Дальнем Востоке, Кавказе, Монголии, Китае и Японии. Из-за

сбора на лекарственное сырье и нарушения естественных местообитаний численность популяций истода сибирского сокращается. Для охраны и сохранения малочисленных ценопопуляций вид занесен в Красные книги 15 областей и 4 республик России, включая и Республику Саха (Якутия) [1].

В Якутии истод сибирский распространен на территории природного парка “Ленские Столбы”, в окрестностях с. Еланка Хангаласского района.

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600973 для авторизованных пользователей.

Обитает на каменистых склонах, луговых степях, сухих сосновых лесах, по галечникам и на залежах [1, 2].

Известно активное использование истода сибирского в народной медицине Китая для лечения лихорадки, воспаления, артралгии и укусов гадюки [3–6].

Известно также, что из растения были выделены полисахариды, флавонолы и производные ксантонов [7, 8].

Истод сибирский применяется в качестве отхаркивающего средства при лечении острых и хронических заболеваний дыхательных путей. В лекарственных целях употребляются корневища и корни. Основным действующим средством являются сапонины, также в корнях содержатся гликозиды, дубильные вещества, смолы, эфирное и жирное масла, глюкоза [9].

В якутской народной медицине используется как лекарственное растение, применяемое в качестве отхаркивающего средства при лечении бронхитов и других острых и хронических заболеваний дыхательных путей. Для приготовления настоев и отваров используют подземные части, которые содержат сапонины, обладающие гемолитическим действием [10].

Первый интродукционный эксперимент с *P. sibirica* в Якутском ботаническом саду был проведен в 1983 г. Из-за сложностей семенного размножения в природных популяциях обнаруживалось очень мало растений прегенеративного возраста, для интродукции переносились растения во взрослом состоянии, которые практически не приживались. В 2004 г. растения были мобилизованы из окрестностей с. Еланка, из которых прижилось около 30%. В культуре у вида наблюдалось нерегулярное плодоношение, не было самовозобновления, из-за этого были сделаны выводы о неэффективности интродукции [11, 12].

Известны работы по введению в культуру *in vitro* на основе различных эксплантов и изучению влияния фитогормонов на размножение *in vitro* некоторых лекарственных видов *Polygala*. Например, для введения в культуру *in vitro* *Polygala myrtifolia* в качестве первичных эксплантов использовали сегменты стеблей верхушечных побегов. При этом высокая скорость пролиферации пазушных побегов наблюдалась при культивировании истода миртолистного на питательной среде МС с добавлением 1.8 мкМ БАП. Полученные микропобеги укоренялись при добавлении в питательную среду 14.3 мкМ ИУК [13].

Эндемичное растение *Polygala antillensis*, находящееся под угрозой исчезновения, вводили в культуру *in vitro* на основе семян и узловых эксплантов. Выращивание проростков *in vitro* проводили микроразмножением на среде МС с добавлением тиадазурина в концентрации 0.3 мг/л.

Исследование позволило рассматривать возможность реинтродукции этого вида на охраняемых территориях [14].

Изучали влияние БАП на развитие культуры истода метельчатого *in vitro* и продукцию метилсалицилата в получаемых проростках. В проростках *Polygala paniculata*, культивируемых на питательной среде МС повышение концентрации БАП с 2 до 4 мг/л снижало продукцию метилсалицилата до 50%. Введение в культуру *in vitro* лекарственного истода метельчатого позволило быстро получать растительное сырье в качестве потенциального источника метилсалицилата [15].

В следующей работе индукцию каллуса истода обманчивого получали на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д в концентрации 4 мкмоль/(л) из листовых эксплантов. При культивировании каллусной ткани на питательной среде МС с добавлением БАП в 2 мкмоль/(л) и НУК в 0.2 мкмоль/(л) через 20 дней появлялись адвентивные почки. Микропобеги *Polygala fallax* хорошо укоренялись при добавлении в питательную среду МС 2,4-Д в концентрации 0.5 мкмоль/(л) [16].

И относительно недавно было показано антагонистическое действие гелеобразующих агентов по отношению к концентрации сахарозы при культивировании *in vitro* лекарственного истода метельчатого. При этом рост культуры истода метельчатого на агаре с сахарозой в концентрации 30 г/л приводил к формированию более толстой листовой пластинки с расширенным губчатым мезофиллом, но более с рыхлыми межклеточными пространствами. В свою очередь рост культуры *Polygala paniculata* на PhytigelTM с сахарозой в концентрации 15 г/л приводил к значительному утолщению палисадного мезофилла листьев. Освещение люминесцентной лампой способствовало наилучшему развитию листьев истода при культивировании на агаризованной питательной среде. Спектральное качество света не влияло на толщину листовой пластинки у растений, выращенных на питательной среде на основе фитогеля. Таким образом, исследование показало влияние комбинации гелеобразователя, качества света и концентрации сахарозы на формирование и анатомическую структуру листьев проростков истода метельчатого, выращиваемых *in vitro* [17].

Однако к настоящему времени неизвестны работы по введению в культуру *in vitro* истода сибирского на основе образцов центрально-якутской популяции, а также по его фитохимическому составу.

Целью исследования является изучение фитохимического профиля наземной фитомассы редкого растения *P. sibirica*, произрастающего в Центральной Якутии, и индукция культуры *in vitro* для последующего размножения с целью реинтродукции.



Рис. 1. *Polygala sibirica* в окрестностях с. Еланка Хангаласского района Якутии (фото Кучаровой Е.В., июнь 2022 г.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для сбора растительного материала истода сибирского *P. sibirica* L. была организована и проведена экспедиция на территории Хангаласского района Якутии (Центральная Якутия, 61°26'32" с.ш., 128°08'08" в.д.) в июне 2022 г. Для фитохимического анализа была собрана надземная фитомасса *P. sibirica*, которая сушилась открытым способом на горизонтальной поверхности без воздействия прямого солнечного света в хорошо проветриваемом помещении. Воздушно-сухую растительную массу хранили в бумажных крафт-пакетах в условиях холодильника при 4–6°C. Для клеточно-культуральных работ были собраны интактные растения истода сибирского с каменистых крутых степных склонов в окрестностях с. Еланка (рис. 1). Интактные растения после транспортировки содержались в условиях климатической камеры MLR-352H (Sanyo, Япония) при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности $70 \pm 5\%$, интенсивности освещения 10000 лк с фотопериодом 18/6.

Для получения высококонцентрированных экстрактов применяли метод фракционной мацерации. Для приготовления экстрактов к навеске 10 г воздушно-сухой надземной фитомассы истода сибирского добавляли метиловый спирт (95%, ХЧ) в соотношении 1 : 20 и настаивали в течение 7 сут при комнатной температуре (20°C). Экс-

тракцию проводили в трех повторностях. Для выполнения разделения многокомпонентных смесей использовался жидкостный хроматограф высокого давления Shimadzu LC-20 Prominence HPLC (Shimadzu, Япония), оборудованный UV-детектором и обратнофазной колонкой Shodex ODP-40 4E (250 × 4.6, размер частиц 4 мкм). Элюировали в градиенте от воды к ацетонитрилу (А, %): 0.0 – 4 мин, 0% А; 4 – 60 мин, 0 – 25% А; 60 – 75 мин, 25 – 100% А; 75 – 120 мин, 100% А, скорость потока 0.5 мл/мин. Весь ВЭЖХ-анализ сделан с UV-VIS-детектором SPD-20A (Kanda-Nishikicho 1-chrome, Shimadzu, Chiyoda-ku, Токио, Япония) при длинах волн 230 и 330 нм; температура 50°C. Объем загрузочной петли составлял 200 мкл. Жидкостный хроматограф высокого давления при прохождении экспериментов был сопряжен с ионной ловушкой amaZon SL в онлайн-режиме. Масс-спектрометрические данные получены с помощью ионной ловушки amaZon SL (Bruker Daltonics, Германия), оснащенной источником ионизации электрораспылением ESI в режимах отрицательных и положительных ионов. Оптимизированные параметры получены следующим образом: температура источника ионизации: 70°C, поток газа гелия: 8 л/мин, газ-небилайзер (распылитель): 7.3 psi, капиллярное напряжение: 4500 V, напряжение на изгибе торцевой пластины:

1500 V, фрагментатор: 280 V, энергия столкновения: 60 eV. Масс-спектрометр использовался в диапазоне сканирования m/z 100 – 1.700 для МС/МС. Произведена фрагментация 4 порядка.

Идентификация соединений производилась путем сравнения значений m/z , RT и моделей фрагментации со спектральными данными MS2, взятыми из научной литературы или путем поиска в базах данных (MS2T, MassBank, HMDB). В качестве эксплантов для введения *P. sibirica* в культуру *in vitro* использовали различные части интактного растения – молодые листья, сегменты стеблей текущего года 0.5–1.5 см длиной с междоузлиями, срезанные с верхней части. Первичную обработку эксплантов проводили 2.5% раствором дезинфицирующего средства “Domestos” (Россия) в течение 15 мин. Затем экспланты выдерживали в 70% растворе этилового спирта в течение 1 мин. Далее экспланты обрабатывали 3% раствором перекиси водорода в течение 1 мин. После каждого реагента экспланты трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Для инициации процесса каллусогенеза простерилизованные экспланты помещали на питательную среду МС с добавлением сахарозы и регуляторов БАП и НУК в концентрациях 0.125/0.025, 0.25/0.05, 0.5/0.1, 0.75/0.15 мг/л, соответственно. Эксплантацию в каждом варианте проводили на чашки Петри по 5 эксплантов и в колбы на 100 мл по 3 экспланта в трех повторностях при температуре 24–25°C, влажности воздуха 60%, при фотопериоде 12/12.

Полученные первичные каллусы пересаживали и культивировали на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д (1 мг/л), БАП (1 мг/л), НУК (1 мг/л) (вариант ДБН) и 2,4-Д (1 мг/л), НУК (1 мг/л), кинетина (1 мг/л) (вариант ДНК).

Для изучения динамики роста каллусной культуры истода сибирского одновременно выращивали в 30 чашках Петри (по 5 каллусов) в течение 30 сут. Каждые 3–4 сут производили взвешивание сырой и сухой массы клеток в трех повторностях по 5 объектов в каждой повторности на электронных весах с точностью до 0.0001 г. Для получения сухой массы клеток сырую массу высушивали в термостате при 60°C в течение 24 ч с последующим охлаждением при комнатной температуре [18]. Для инициации непрямого морфогенеза каллусные культуры *P. sibirica* были пересажены на питательную среду МС с добавлением БАП в концентрациях 0.5 и 1 мг/л. Эффективность индукции образования побегов фиксировали на 30 сут культивирования подсчетом количества образовавшихся побегов. Образовавшиеся микроростки разделяли и пересаживали для размножения на питательную среду МС с добавлением БАП в концентрации 1 мг/л. Клонально размноженные микрорастения культивировали в клима-

тической камере Sanyo MLR-352H (Sanyo, Япония) при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности $70 \pm 5\%$, интенсивности освещения 5000 лк, а также в условиях фитостеллажа “Стеллар-ФИТО Line P6-C” (АНО “АВТех”, Москва, РФ) при температуре 25–27°C, влажности 60%, интенсивности освещения 5000 лк с фотопериодом 18/6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа фитохимического профиля надземной фитомассы истода сибирского, произрастающего в Центральной Якутии, были подготовлены метанольные экстракты в трех повторностях. Для удобства идентификации была составлена унифицированная системная таблица целевых аналитов, выделенных из экстрактов надземной фитомассы *P. sibirica* (Дополнительные материалы, табл. 1). В результате проведенного масс-спектрометрического исследования всего предположительно идентифицировано 74 химических соединения, из них 43 соединения представляют полифенольную группу.

Впервые были идентифицированы 40 химических соединений в пределах рода *Polygala*, из них 22 полифенолов: флавонов – 5, флавонолов – 5, флаван-3-олов – 4, флаванонон – 2, фенольных кислот – 1, антоцианов – 5.

Для примера представлены масс-спектры впервые обнаруженных полифенолов. На рис. 2 представлен масс-спектр флавана синрингетина. Протонированный ион синрингетина с m/z 347.18 в результате фрагментации продуцирует два дочерних иона с m/z 332.13 и m/z 286.11. Далее фрагментарный ион с m/z 332.13 порождает один ион с m/z 286.16, после чего представлена четвертая по счету фрагментация с одним полученным в результате фрагментации ионом с m/z 271.11. По итогам данной масс-спектрометрии и сверяясь с научными данными из литературных источников, мы можем утверждать, что данная фрагментация ориентировочно представляет масс-спектр синрингетина. Наш вывод подтверждают данные полученных масс-спектров из экстрактов *Carpobrotus edulis* [26].

На рис. 3 представлен предположительно масс-спектр флаван-3-ола эпикатехина. Протонированный ион эпикатехина с m/z 291.27 в результате фрагментации произвел три дочерних иона с m/z 261.16, m/z 243.21 и m/z 157.20. Далее ион с m/z 261.16 фрагментировался на три иона с m/z 191.13, m/z 173.16 и m/z 143.19, после чего следовала четвертая по счету фрагментация, в результате которой получено три иона с m/z 161.04, m/z 143.15 и m/z 125.18. Ориентировочно данная фрагментация представляет масс-спектр эпикатехина, что подтверждают данные из научных статей, где представлены подобные масс-спектры

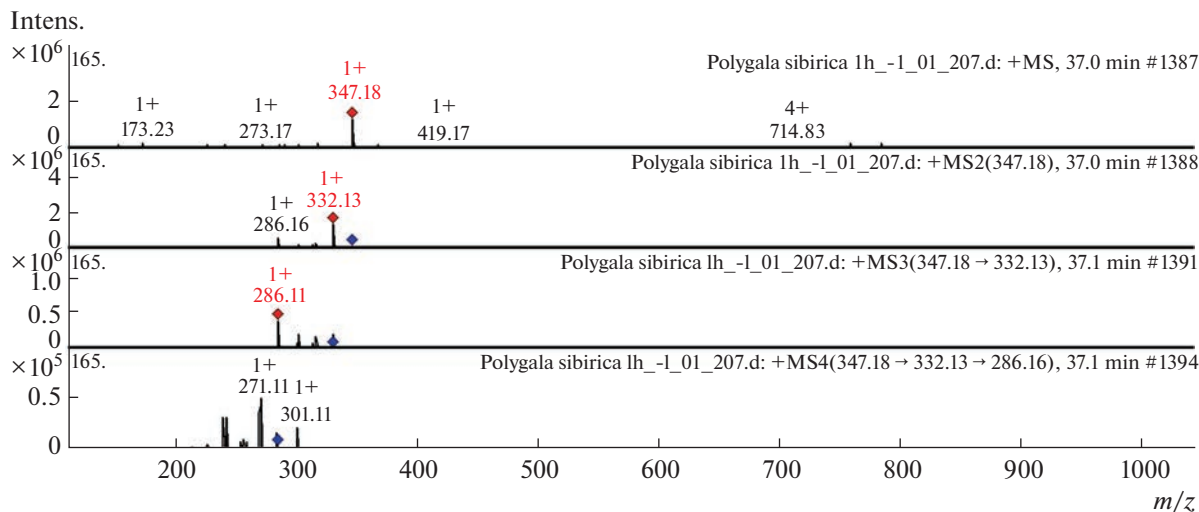


Рис. 2. Масс-спектр синрингетина из экстракта надземной фитомассы *Polygala sibirica*, m/z 347.18.

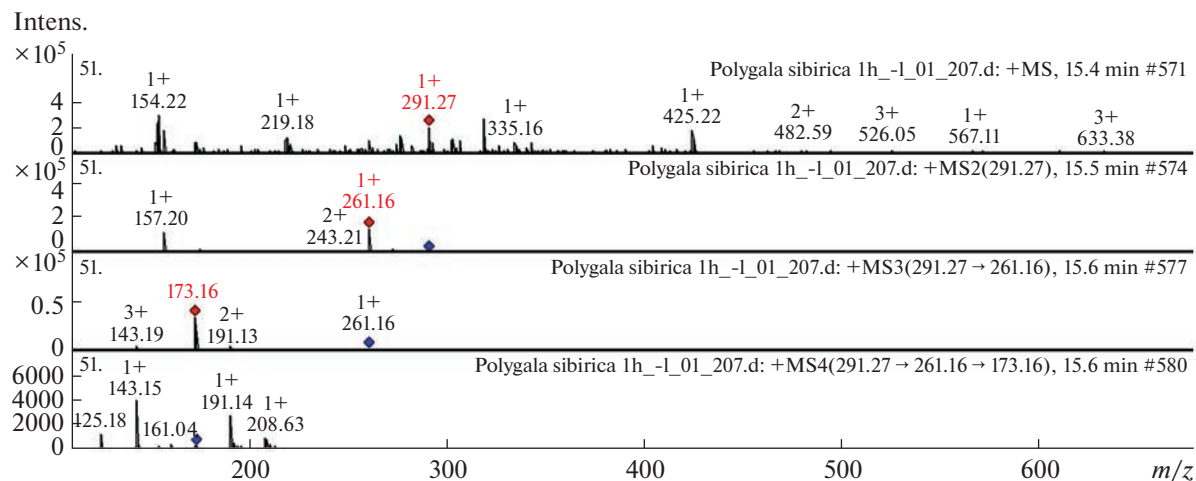


Рис. 3. Масс-спектр эпикатехина из экстракта надземной фитомассы *Polygala sibirica*, m/z 291.27.

из экстрактов *Grataegi Fructus* [27], *Camellia kucha* [40], *Cassia granidis* [41], *Cassia abbreviata* [42], *Radix polygoni multiflori* [43].

В ходе работ нами был получен первичный каллус *P. sibirica* из листовых эксплантов интактных растений при культивировании на питательной среде с добавлением БАП и НУК в концентрациях 0.25/0.05 и 0.5/0.1 мг/л (рис. 4а). При культивировании листовых эксплантов на среде МС с добавлением БАП и НУК в концентрациях 0.125/0.025; 0.75/0.15 мг/л, соответственно, а также стеблевых эксплантов на среде МС с добавлением всех апробированных концентраций БАП и НУК каллусогенеза в течение 30 сут не наблюдалось.

Сравнительный анализ динамики роста биомассы клеток каллусной культуры клеток истода сибирского показал, что при культивировании пер-

вичных каллусов на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д (1 мг/л), БАП (1 мг/л), НУК (1 мг/л) наблюдался прирост сырой массы на 0.674 г, на среде с заменой НУК на кинетин (1 мг/л) прирост составил 0.267 г на 30 сутки культивирования (рис. 5). Прирост сухой массы клеток на варианте культивирования с НУК (1 мг/л) составил 0.087 г, а на варианте с кинетином — 0.035 г (рис. 6).

Часть полученных первичных каллусных культур истода сибирского была использована для инициации непрямого морфогенеза с добавлением в питательную среду МС разных концентраций фитогормона БАП. При этом не прямой морфогенез наблюдался на вариантах с добавлением БАП в концентрациях 0.5 и 1 мг/л (рис. 4б).

Однако, при культивировании на питательной среде МС с БАП (0.5 мг/л) побегообразование останавливалось через 2 нед. и растения начина-

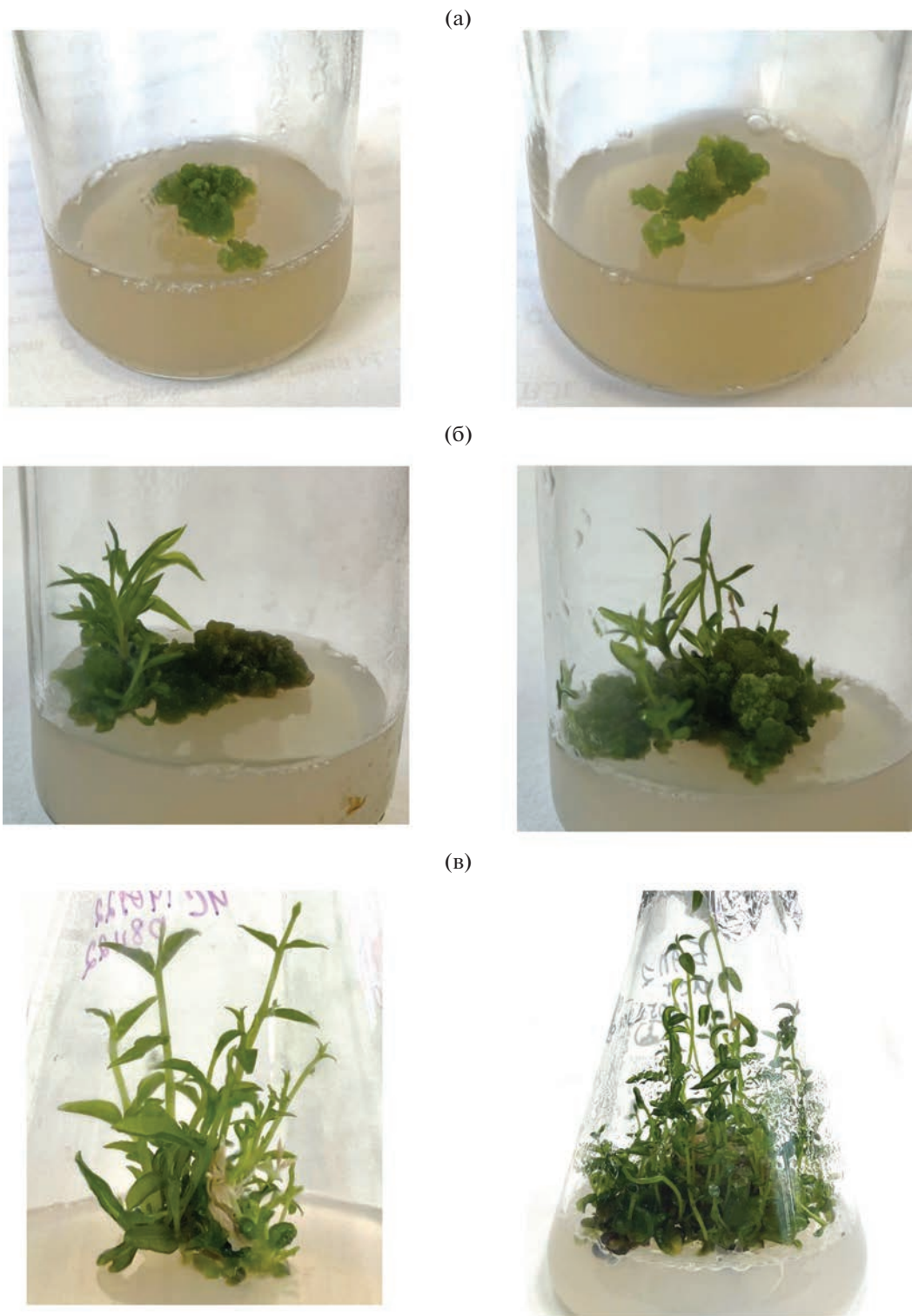


Рис. 4. Первичные каллусы (а), не прямой морфогенез (б) и побегообразование (в) *Polygala sibirica* in vitro.

ли желтеть и отмирать. При продолжении культивирования на МС-среде с добавлением БАП в концентрации 1 мг/л наблюдалось интенсивное побегообразование, окраска побегов растения была насыщенно-зеленой (рис. 4в). При этом в

одной колбе с каллусной тканью развивалось от 10 до 20 микропобегов в течение 30 суток культивирования. Микропобеги разделяли с последующей пересадкой для микроразмножения на МС-среду с таким же составом.

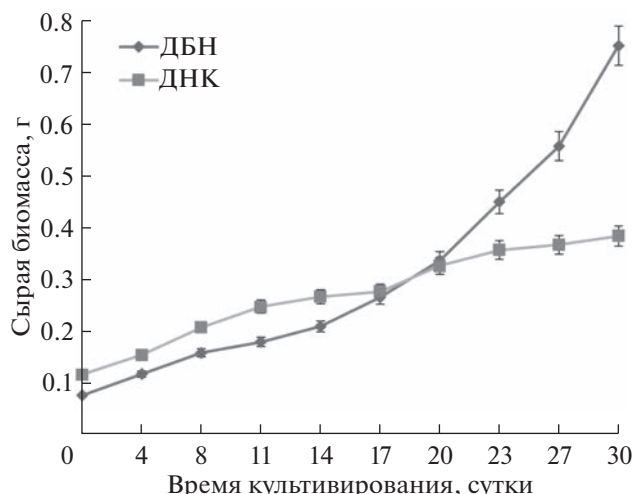


Рис. 5. Динамика роста сырой массы клеток каллусной культуры *Polygala sibirica* на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д (1 мг/л), БАП (1 мг/л), НУК (1 мг/л) (вариант ДБН) и 2,4-Д (1 мг/л), НУК (1 мг/л), кинетина (1 мг/л) (вариант ДНК).

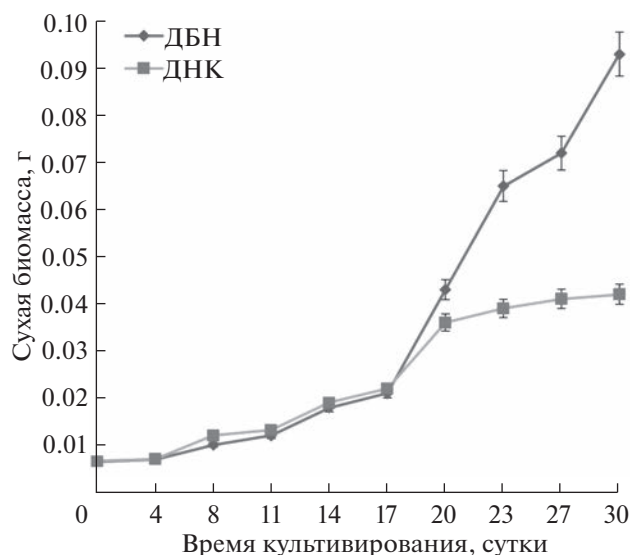


Рис. 6. Динамика роста сухой массы клеток каллусной культуры *Polygala sibirica* на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д (1 мг/л), БАП (1 мг/л), НУК (1 мг/л) (вариант ДБН) и 2,4-Д (1 мг/л), НУК (1 мг/л), кинетина (1 мг/л) (вариант ДНК).

ОБСУЖДЕНИЕ

В более ранних исследованиях фитохимического состава корней истода сибирского, произрастающего в Китае, были идентифицированы ксантаны, флавоноиды, тритерпеноиды и сапонины, в том числе сибирикоза А₄ [58], рамнетин 3-*O*-бета-галактопиранозид, полигалактенозид А [38], тенуифолин [59], а также в надземной части — полигалины А и С, полигалин Е, рамнетин I и II,

рамнетин 3-*O*-бета-галактопиранозид, сибирикасапонины А, В и Е [29], а также полигалины I и H [30], которые также обнаружены и идентифицированы в метанольном экстракте надземной фитомассы *P. sibirica*, произрастающего в Центральной Якутии (табл. 1).

Как мы отмечали ранее, в экстракте надземной фитомассы истода сибирского центрально-якутской популяции впервые для рода *Polygala* выявлено 40 соединений. Из группы полифенольных соединений впервые идентифицированы 5 флавонов, в том числе изоформононетин, сирингетин, апигенин 7-*O*-глюкозид, 5 флавонолов, в том числе гербацетин, мирицетин, 4 флаван-3-ола (афзелехин, эпикатехин и др.), флавононы, гесперитин и эриоцитрин, фенольная кислота и 5 антоцианов, всего 22 полифенольных соединения. Из других групп соединений для рода *Polygala* впервые идентифицировано 18 индивидуальных соединений, включая L-триптофан, миристолеиновую, линоленовую, эйкозадиеновую и пентакозеновую кислоты, иридоиды, ксантаны, каротиноид, алкалоид (сеспендол) и другие (табл. 1).

Одним из первых введение в культуру *in vitro* из представителей рода *Polygala* было выполнено для истода миртолистного *Polygala myrtifolia*, где в качестве первичных эксплантов использовали сегменты стеблей верхушечных побегов. При этом активную индукцию побегов наблюдали при культивировании эксплантов на среде МС с добавлением 6-бензиладенина [13]. Эндемичное редкое растение *Polygala antillensis* было введено в культуру *in vitro* на основе семян и узловых эксплантов [14]. Успешно было введено в культуру *in vitro* лекарственное растение истод метельчатый *Polygala paniculata* при культивировании на питательной среде МС с добавлением БАП в концентрации 2 мг/л и с наибольшей продукцией метилсалицилата [15]. Индукцию каллусной культуры истода обманчивого *Polygala fallax* получали на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д из листовых эксплантов, а при культивировании полученных каллусов на среде МС с добавлением БАП и НУК инициировался органогенез [16].

В настоящей работе получены первичные каллусы *P. sibirica* из листовых эксплантов на питательной среде МС с добавлением БАП и НУК (рис. 4а). На основе первичных каллусов были получены стабильно растущие каллусные культуры, на которых изучена динамика роста каллусной биомассы в течение 30 суток. Исходя из полученных данных, подходящим вариантом для лучшего прироста биомассы является среда МС с добавлением 2,4-Д (1 мг/л), БАП (1 мг/л), НУК (1 мг/л), где прирост сырого веса больше в 1.9 ± 0.2 раза, сухого веса в 5.5 ± 0.1 раза, чем на варианте питательной среды с добавлением 2,4-Д и НУК в соче-

тании с кинетином (рис. 5, 6). На основе полученных каллусов нами инициирован не прямой морфогенез с интенсивным побегообразованием при культивировании на среде МС с добавлением БАП в концентрации 1 мг/л (рис. 4в).

Данные анализа фитохимического профиля экстрактов надземной фитомассы истода сибирского, произрастающего в Центральной Якутии, показали присутствие большой разновариантности полифенолов и соединений других химических групп. Результаты по получению каллусной культуры, индукции морфогенеза *in vitro* и заложению основ к микроразмножению позволят выполнить масштабирование получения микроклонов *Polygala sibirica*, индукцию *in vitro* корнеобразования, затем адаптирование укорененных растений в условиях закрытого и открытого грунта.

Таким образом, заложена основа для размножения истода сибирского с целью реинтродукции в условиях Якутского ботанического сада и сохранения данного редкого вида, обладающего комплексом полифенольных и других групп соединений.

Исследование выполнено в Северо-Восточном федеральном университете за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-20031, <https://rscf.ru/project/22-14-20031/> и гранта Якутского научного фонда на основании договора № 38 от 11 мая 2023 года.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т.1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н.С. Данилова. Москва: Реарт, 2017. 412 с.
2. Егорова А.А. Сосудистые растения Юго-Западной Якутии. Новосибирск: Наука, 2013. 203 с.
3. Chen S.K., Li H., Chen B.Y. Flora of China. Beijing, China: Science Press, 1997. 195 p.
4. Wu Z.Y., Li X.W. Yunnan Plant Annals. Beijing, China: Science Press, 1983. 287 p.
5. Luo X.R. Practical color atlas of Chinese herbal medicine. Guangzhou, China: Guangdong Science and Technology Press, 1995. 16 p.
6. Yu H.Z., Wu H. Studies on anti-snake venom activity of ethanol extract from *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. // Chin. J. Ethnomed. Ethnopharm. 2008. V. 17. P. 3.
7. Wei Y.J., Zhou Q.J., Huang S.Y., Zhou J., Zhang J.M., Wan Y., Wu H. Extraction and purification of *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. Polysaccharides // J. Jiansu Norm. Univ. Nat. Sci. Ed. 2014. V. 31. P. 60.
8. Wan Y., Yu H.Z., Ye L., Zhang F.R., Wu H. Flavonol and xanthone derivatives from *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. // J. Southwest. Univ. 2006. V. 7. P. 51.
9. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1991. 431 с.
10. Макаров А.А. Лекарственные растения Якутии. Якутск: Бичик, 2001. 127 с.
11. Борисова С.З. Степи Центральной Якутии: интродукционный очерк. Новосибирск: Наука, 2008. 96 с.
12. Данилова Н.С. Результаты интродукции редких и эндемичных растений Якутии в Якутском ботаническом саду // Наука и образование. 2017. № 1. С. 97.
13. Iapichino G. Improved micropropagation in *Polygala myrtifolia* // In vitro cellular and developmental biology – Plant. 2004. V. 40(1). P. 86. <https://doi.org/10.1079/IVP2003478>
14. Georges D., Le Hir F. Multiplication in vitro d'une espèce menacée, endémique de l'île de La Martinique: *Polygala antillensis* Chodat, Polygalaceae // Acta Bot. Gallica. 2008. V. 155(4). P. 477. <https://doi.org/10.1080/12538078.2008.10516127>
15. Victório C.P., Carriço J.B., Lage C.L.S. *Polygala paniculata*: a source of methyl salicylate produced through plant tissue culture // Rev. Ceres. 2011. V. 58(3). P. 269. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300003>
16. Yang G., Luo J., Mo Y.W., Chen H.F. Tissue culture and rapid propagation in vitro of *Polygala fallax* // Plant Physiol. J. 2016. V. 52(3). P. 349. <https://doi.org/10.13592/j.cnki.pppj.2015.0688>
17. Nery L.A., Batista D.S., Rocha D.I., Felipe S.H.S., Queiroz M.da.S., Silva P.O., Ventrella M.C., Otoni W.C. Leaf development and anatomy of *in vitro*-grown *Polygala paniculata* L. are affected by light quality, gelling agents, and sucrose // Vegetos. 2021. V. 34. P. 19. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00192-3>
18. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бинум. Лаборатория знаний, 2012. С. 386.
19. Wang F., Huang S., Chen Q., Hu Z., Li Z., Zheng P., Liu X., Li S., Zhang S., Chen J. Chemical characterisation and quantification of the major constituents in the Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen pill by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-QQQ-MS/MS // Phytochem. Anal. 2020. V. 31(6). P. 915. <https://doi.org/10.1002/pca.2963>
20. Trifan A., Zengin G., Sinan K.I., Sieniewska E., Sawicki R., Maciejewska-Turska M., Skalikca-Wozniak K., Luca S.V. Unveiling the phytochemical profile and biological potential of five *Artemisia* species // Antioxidants. 2022. V. 11(5). P. 1017. <https://doi.org/10.3390/antiox11051017>
21. Ikeya Y., Sugama K., Maruno M. Xanthone C-glycoside and acylated sugar from *Polygala tenuifolia* // Chem. Pharm. Bull. 1994. V. 42(11). P. 2305. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.2305>
22. Yin Y., Zhang K., Wei L., Chen D., Chen Q., Jiao M., Li X., Huang J., Gong Z., Kang N., Li F. The molecular mechanism of antioxidation of hiolisu oral liquid based on serum analysis and network analysis // Front Pharmacol. 2021. V. 12. P. 710976. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710976>

23. Belmehdi O., Bouyahya A., Jeko J., Cziaky Z., Zengin G., Sotko G., El Baaboua A., Senhaji N.S., Abrini J. Synergistic interaction between propolis extract, essential oils, and antibiotics against *Staphylococcus epidermidis* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* // Int. J. Second Metab. 2021. V. 8(3). P. 195. <https://doi.org/10.21448/ijsm.947033>
24. Zengin G., Mahomoodally M.F., Sinan K.I., Ak G., Etienne O.K., Sharmeen J.B., Brunetti L., Leone S., Di Simone S.C., Recinella L., Chiavaroli A., Menghini L., Orlando G., Jekő J., Cziaky Z., Ferrante C. Chemical composition and biological properties of two *Jatropha* species: Different parts and different extraction methods // Antioxidants. 2021. V. 10(5). P. 792. <https://doi.org/10.3390/antiox10050792>
25. Xu L.L., Xu J.J., Zhong K.R., Shang Z.P., Wang F., Wang R.F., Liu B. Analysis of non-volatile chemical constituents of *Menthae haplocalycis* herba by ultra-high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry // Molecules. 2017. V. 22(10). P. 1756. <https://doi.org/10.3390/molecules22101756>
26. Hamed A.R., El-Hawary S.S., Ibrahim R.M., Abdelmohsen U.R., El-Halawany A.M. Identification of chemopreventive components from halophytes belonging to Aizoaceae and Cactaceae through LC/MS bioassay guided approach // J. Chrom. Sci. 2021. V. 59(7). P. 618. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa112>
27. Huang Y., Yao P., Leung K.W., Wang H., Kong X.P., Wang L., Dong T.T.X., Chen Y., Tsim K.W.K. The yin-yang property of Chinese medicinal herbs relates to chemical composition but not anti-oxidative activity: an illustration using spleen-meridian herbs // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1304. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01304>
28. Li T.-Z., Zhang W.-D., Yang G.-J., Liu W.-Y., Liu R.-H., Zhang C., Chen H.-S. New flavonol glycosides and new xanthone from *Polygala japonica* // J. Asian Nat. Prod. Res. 2006. V. 8(5). P. 401. <https://doi.org/10.1080/10286020500172558>
29. Song Y.-L., Zhou G.-S., Zhou S.-X., Jiang Y., Tu P.-F. Polygalins D–G, four new flavonol glycosides from the aerial parts of *Polygala sibirica* L. (Polygalaceae) // Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. 2013. V. 27(13). P. 1220. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.724412>
30. Huang Y.-J., Zhou L.-Y., Wang J.-M., Li Q., Geng Y.-Y., Liu H.-Y., Hua Y. Two New Flavonol Glycosides from *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. // Molecules. 2015. V. 20(12). P. 21494. <https://doi.org/10.3390/molecules201219775>
31. Geng P., Sun J., Zhang M., Li X., Harnly J. M., Chen P. Comprehensive characterization of C-^oglycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC^o-PDA^o-ESI/HRMSn and mass defect filtering // J. Mass Spectrom. 2016, V. 51(10). P. 914. <https://doi.org/10.1002/jms.3803>
32. Abu-Reidah I.M., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Arraes-Roman D., Segura-Carretero A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits // Food Chem. 2015. V. 166. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
33. Yin N.-W., Wang S.-X., Jia L.-D., Zhu M.-C., Yang J., Zhou B.-J., Yin J.-M., Lu K., Wang R., Li J.-N., Qu C.-M. Identification and characterization of major constituents in different-colored rapeseed petals by UPLC–HESI-MS/MS // Agric. Food Chem. 2019. V. 67(40). P. 11053. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05046>
34. El-Sayed M.A., Abbas F.A., Refaat S., El-Shafae A.M., Fikry E. UPLC-ESI-MS/MS profile of the ethyl acetate fraction of aerial parts of *Bougainvillea* “Scarlett O’Hara” cultivated in Egypt // Egypt. J. Chem. 2020. V. 64(2). P. 793. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2020.45694.2933>
35. Zapesochneya G.G., Kurkin V.A., Shchavlinskii A.N. Flavonoids of the above-ground part of *Rhodiola rosea*. II. Structure of novel glycosides of herbacetin and gossypetin // Chem. Nat. Compd. 1985. V. 4. P. 496.
36. Aabideen Z.U., Mumtaz M.W., Akhtar M.T., Mukhtar H., Raza S.A., Touqeer T., Saari N. Anti-obesity attributes; UHPLC-QTOF-MS/MS-based metabolite profiling and molecular docking insights of *Taraxacum officinale* // Molecules. 2020. V. 25(21). P. 4935. <https://doi.org/10.3390/molecules25214935>
37. Chen Y., Cai X., Li G., He X., Yu X., Yu X., Xiao Q., Xiang Z., Wang C. Chemical constituents of radix *Actinidia chinensis* planch by UPLC-QTOF-MS // Biomed. Chromatogr. 2021. 35(7). e5103. <https://doi.org/10.1002/bmc.5103>
38. Zhou Y.-H., Zhang S.-Y., Guo Q., Chai X.-Y., Jiang Y., Tu P.-F. Chemical investigation of the roots of *Polygala sibirica* L. // Chin. J. Nat. Med. 2014. V. 12(3). P. 225.
39. Hassan W., Abdelaziz S., Yousef H. Chemical composition and biological activities of the aqueous fraction of *Parkinsonia aculeata* L. growing in Saudi Arabia // Arabian J. Chem. 2019. V. 12(3). P. 377. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.08.003>
40. Qin D., Wang Q., Li H., Jiang X., Fang K., Wang Q., Li B., Pan C., Wu H. Identification of key metabolites based on non-targeted metabolomics and chemometrics analyses provides insights into bitterness in Kucha (*Cammellia kucha* (Chang et Wang) Chang) // Food Res. Int. 2020. V. 138 (Pt B). 109789. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109789>
41. Marcia Fuentes J.A., Lopez-Salas L., Borrás-Linares I., Navarro-Alarcon M., Segura-Carretero A., Lozano-Sanchez J. Development of an innovative pressurized liquid extraction procedure by response surface methodology to recover bioactive compounds from Carao tree seeds // Foods. 2021. V. 10(2). P. 398. <https://doi.org/10.3390/foods10020398>
42. Sobeh M., Mahmoud M.F., Abdelfattah M.A.O., Cheng H., El-Shazly A.M., Wink M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities *in vivo* // J. Ethnopharmacol. 2018. V. 213. P. 38. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.007>
43. Zhu Z.-W., Li J., Gao X.-M., Amponse E., Kang L.-Y., Hu L.-M., Zhang B.-L., Chang Y.-X. Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygoni multiflori* by LC-MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. V. 62. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.11.002>

44. Razgonova M.P., Tekutyeva L.A., Podvolotskaya A.B., Stepanchikina V.D., Zakharenko A.M., Golokhvast K.S. *Zostera marina* L.: supercritical CO₂-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents recovered from seagrass // *Separations*. 2022. V. 9(7). P. 182.
<https://doi.org/10.3390/separations9070182>
45. Songserm P., Klanrit P., Phetcharaburanin J., Thanonkeo P., Apiraksakorn J., Phomphrai K., Klanrot P. Antioxidant and anticancer potential of bioactive compounds from *Rhinacanthus nasutus* cell suspension culture // *Plants*. 2022. V. 11(15). P. 1994.
<https://doi.org/10.3390/plants11151994>
46. Ruiz A., Hermosín-Gutiérrez I., Vergara C., von Baer D., Zapata M., Hirschfeld A., Obando L., Mardones C. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS // *Food Res. Int.* 2013. V. 51(2). P. 706.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.043>
47. Ruiz A., Hermosín-Gutiérrez I., Mardones C., Vergara C., Herlitz E., Vega M., Dorau C., Winterhalter P., von Baer D. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58(10). P. 6081.
<https://doi.org/10.1021/jf100173x>
48. Oertel A., Matros A., Hartmann A., Arapitsas P., Dehmer K.J., Martens S., Mock H.P. Metabolite profiling of red and blue potatoes revealed cultivar and tissue specific patterns for anthocyanins and other polyphenols // *Planta*. 2017. V. 246(2). P. 281.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2718-4>
49. Zhu Z., Guan Q., Koubaa M., Barba F.J., Roohenejad S., Cravotto G., Yang X., Li S., He J. HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction // *Food Chem.* 2017. V. 215. P. 391.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.157>
50. Mekam P.N., Martini S., Nguefack J., Tagliazucchi D., Stefani E. Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta* L. leaves showing antioxidant and antifungal properties // *S. Afr. J. Bot.* 2019. V. 127(3). P. 319.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.001>
51. Wu Y., Xu J., He Y., Shi M., Han X., Li W., Zhang X., Wen X. Metabolic profiling of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) during fruit development and maturation // *Molecules*. 2019. V. 24(6). P. 1114.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061114>
52. Ozarowski M., Piasecka A., Paszel-Jaworska A., Siqueira de A., Chaves D., Romaniuk A., Rybczynska M., Gryszczyńska A., Sawikowska A., Kachlicki P., Mikolajczak P.L., Seremak-Mrozikiewicz A. Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and *in vitro* cytotoxic potential on leukemia cell lines // *Braz. J. Pharmacol.* 2018. V. 28(2). P. 179.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.01.006>
53. Marston A., Hamburger M., Sordat-Diserens I., Msonthi J.D., Hostettmann K. Xanthones from *Polygala nyikensis* // *Phytochemistry*. 1993. V. 33(4). P. 809.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85279-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85279-Z)
54. Ekeberg D., Flate P.-O., Eikenes M., Fongen M., Naess-Andresen C.F. Qualitative and quantitative determination of extractives in heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1109(2). P. 267.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.027>
55. Llorent-Martínez E.J., Spinola V., Gouveia S., Castilho P.C. HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa* // *Ind. Crops Prod.* 2015. V. 69. P. 80.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.014>
56. Sun L., Tao S., Zhang S. Characterization and quantification of polyphenols and triterpenoids in thinned young fruits of ten pear varieties by UPLC-Q TRAP-MS/MS // *Molecules*. 2019. V. 24(1). P. 159.
<https://doi.org/10.3390/molecules24010159>
57. Heffels P., Buhrle F., Schieber A., Weber F. Influence of common and excessive enzymatic treatment on juice yield and anthocyanin content and profile during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) juice production // *Eur. Food Res. Technol.* 2017. V. 243. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s00217-016-2722-0>
58. Miyase T., Noguchi H., Chen X.-M. Sucrose esters and xanthone C-glycosides from the roots of *Polygala sibirica* // *J. Nat. Prod.* 1999. V. 62(7). P. 993.
<https://doi.org/10.1021/np990084t>
59. Zhou Y.-H., Zhang S.-Y., Guo Q., Chai X.-Y., Jiang Y., Tu P.-F. Chemical investigation of the roots of *Polygala sibirica* L. // *Chin. J. Nat. Med.* 2014. V. 12(3). P. 225.
[https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60038-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60038-8)
60. Cheng M.-C., Li C.-Y., Ko H.-C., Ko F.-N., Lin Y.-L., Wu T.-S. Antidepressant principles of the roots of *Polygala tenuifolia* // *J. Nat. Prod.* 2006. V. 69(9). P. 1305.
<https://doi.org/10.1021/np060207r>
61. Han D., Chen C., Zhang C., Zhang Y., Tang X. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. V. 51(1). P. 260.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.021>
62. Delgado-Pelayo R., Hornero-Mendez D. Identification and quantitative analysis of carotenoids and their esters from sarsaparilla (*Smilax aspera* L.) Berries // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60(33). P. 8225.
<https://doi.org/10.1021/jf302719g>
63. Zhang D., Miyase T., Kuroyanagi M., Umehara K., Noguchi H. Oligosaccharide polyesters from roots of *Polygala glomerata* // *Phytochemistry*. 1998. V. 47(1). P. 45.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00490-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00490-1)

УДК 581.1:58.084.1:633.812:582.929.4:577.127.4:620.3

УПРАВЛЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ И КАЛУСНЫХ КУЛЬТУР

Ocimum basilicum L. *in vitro*

© 2023 г. М. Ю. Чередниченко^{а, *}, О. Б. Поливанова^а, Д. А. Хлебникова^а, О. Ю. Словарева^б,
Р. Н. Киракосян^а, Е. А. Калашникова^а

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева”, Москва, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение “Всероссийский центр карантина растений”,
Московская область, г.о. Раменский, р.п. Быково, Россия

*e-mail: cherednichenko@rgau-msha.ru

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

После доработки 14.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Получены калусные культуры и микроклоны *in vitro* базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) и исследованы их ростовые и биохимические особенности в зависимости от гормонального состава МС-среды, а также от добавления в питательную среду наночастиц (НЧ) феррата цинка. При клональном микроразмножении образцов отмечалось преимущество различных вариантов состава питательных сред: добавление в МС-среду НУК — для сортов Любимчик и Василиск; ИМК — для сорта Фиолетовый бархат и видового образца из Германии; ИУК — для видовых образцов из Польши и Италии. Необходимо отметить, что растения фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат предпочитали МС-среду, содержащую минеральные соли в концентрации $\frac{1}{2}$ нормы. Результаты исследования подтвердили выдвинутую разными авторами гипотезу о способности микрорастений и калусных клеток базилика накапливать вторичные метаболиты, а также возможность управления этим процессом с помощью биологических (минеральный и гормональный состав питательной среды) и физических (НЧ) элиситоров. Показано, что присутствие в составе МС-среды НЧ феррата цинка способствовало формированию калусной ткани разного типа плотности и цвета. Добавление в МС-среду 25 мкг/л НЧ существенно увеличивало сырую биомассу калусной ткани по сравнению с другими вариантами опыта. В этом варианте индекс роста калусной ткани был наибольшим и составил 3.55. При увеличении концентрации НЧ до 50 мкг/л отмечено снижение индекса роста, что свидетельствует об ингибирующем их действии на пролиферативную активность дедифференцированных клеток. В полученных клеточных культурах проведен комплексный анализ фенольных соединений. Выявлено отсутствие зависимости накопления суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов от концентрации НЧ в МС-среде.

Ключевые слова: *Ocimum basilicum*, *in vitro*, клональное микроразмножение, каллусогенез, вторичные метаболиты, фенольные соединения, флавоноиды, наночастицы, биологическая элиситация, физическая элиситация

DOI: 10.31857/S0015330323600778, **EDN:** ZQSCWE

ВВЕДЕНИЕ

Род базилик (*Ocimum* L.) включает 67 видов однолетних и многолетних травянистых растений и кустарников, относящихся к подсемейству Котовниковые (*Nepetoideae*) семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) [1]. В диком виде представители этого рода произрастают в Южной Америке, Иране, Китае, на юге Европейской части России, на Кав-

казе, в Средней Азии и на Дальнем Востоке. Многие виды рода базилик культивируют в Западной Европе, Азии, Африке и Америке [2]. Виды базилика различаются по характеру запаха, степени ароматичности, окраске и площади листовой пластинки, габитусу куста. У растений с мелким листом сбор эфирного масла на 10% больше, чем у растений с крупным листом.

Базилик душистый (*O. basilicum* L.) содержит огромный спектр биологически активных веществ (БАВ), например, эфирные масла (до 1.5%), фенольные соединения (включая флавоноиды и ан-

Сокращения: БАВ — биологически активные вещества; ССФС — суммарное содержание фенольных соединений; НЧ — наночастицы.

тоцианы), дубильные вещества (до 6%), гликозиды, сапонины, аскорбиновую кислоту, клетчатку, сахара, минеральные вещества [3]. Базилик душистый используют как источник рутина — витамина Р и каротина, а препараты на его основе применяют для стимуляции сердечной и дыхательной систем, что связано с наличием в эфирном масле камфоры.

Повысить содержание БАВ в растении можно путем выращивания культуры клеток и тканей *in vitro*. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными способами получения БАВ, таких как, возможность регуляции синтеза целевых продуктов с помощью контроля факторов роста, подбора оптимального режима культивирования для отдельных сортов и др. Метод культуры клеток и тканей *in vitro* можно использовать как альтернативу химическому производству БАВ.

Обоснованность проведения данного исследования связана с сортоспецифической реакцией растений на условия культивирования *in vitro*. Кроме того, метод культуры клеток и тканей позволяет получать генетически стабильный растительный материал, который может представлять большой научный интерес для дальнейших исследований по получению штаммов-суперпродукентов.

Цель работы — получение каллусной ткани и асептических микроклонов растений различных сортов и *ex vitro* популяций базилика душистого, а также изучение возможности управления биосинтетическим потенциалом, используя биологические (минеральный и гормональный состав питательной среды для культивирования) и физические (наночастицы) элиситоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения микроклонов и каллусной ткани базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) использовали семена следующих сортов: Любимчик (ООО “Агрофирма Аэлита”), Василиск (Компания “Гавриш”), Фиолетовый бархат (ООО “Биотехника-СПб”). В работе также использовали видовые семена *O. basilicum*, полученные из ботанических садов Европы: Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, Польша (далее по тексту образец обозначен как Poland), Plantentuin Meise, Бельгия (далее Belgium), Orto Botanico dell’Università di Siena, Италия (далее Italy), Botanischer Garten Tübingen, Германия (далее Germany).

Семена стерилизовали 5% раствором NaOCl или 0.1% раствором HgCl₂, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высевали в чашки Петри (диаметр 90 мм) на агаризованную МС-среду [4] без добавления регуляторов роста. pH МС-среды доводили до 5.6–5.8 перед автокла-

вированием. Чашки Петри с семенами помещали на стеллажи под белые линейно-люминесцентные лампы (OSRAM AG, Германия) с интенсивностью освещения 150 мкмоль/м² с, и проращивали при температуре 23 ± 1°C и 16-часовом световом дне.

В дальнейшем 14-дневные проростки пересаживали в пластиковые контейнеры объемом 500 мл на безгормональную МС-среду для формирования асептических растений с правильной морфологией.

Все работы по стерилизации семян, введению в культуру *in vitro*, по изучению каллусогенеза и морфогенеза проводили в асептических условиях ламинарного бокса.

Клональное микроразмножение сортов *O. basilicum*. Асептические растения *O. basilicum* трех сортов в возрасте 10 нед. черенковали и помещали на МС-среды, содержащие минеральные соли в концентрации 1 нормы или ½ нормы без добавления фитогормонов и регуляторов роста или с добавлением 0.5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), нафтилуксусной кислоты (НУК) или индолилмасляной кислоты (ИМК). Учет параметров (высота растений (см), количество листьев (шт.), частота корнеобразования (%)) проводили на 42 сут. культивирования.

Клональное микроразмножение видовых растений *O. basilicum* зарубежных *ex situ* популяций. Асептические видовые растения, полученные из 4 европейских ботанических садов (Польша, Бельгия, Италия, Германия), в возрасте 1 мес. разделяли на черенки и помещали на МС-среду без добавления фитогормонов (контроль) и с добавлением 1 мг/л ИУК или ИМК. Учет параметров (высота растений (см), количество листьев (шт.), частота корнеобразования (%)) проводили на 42 сут. культивирования.

Индукция каллусогенеза и органогенеза. Каллусную ткань получали из различных типов экспланта (сегменты семядольных листьев, гипокотили, сегменты листовой пластинки, сегменты междоузлий, узлы) на МС-среде, дополненной регуляторами роста: ИУК (0.5 мг/л) в сочетании с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) (2 мг/л); БАП (1 мг/л); БАП (3 мг/л) в сочетании с ИУК (0.3 мг/л). Контролем служила безгормональная МС-среда. Повторность опыта 5-кратная, по 10 эксплантов каждого типа на повторность.

Выращивание каллусной культуры осуществляли в чашках Петри (диаметр 90 мм) при освещении белыми линейно-люминесцентными лампами (OSRAM, Германия) — интенсивность освещения 150 мкмоль/м² с и 16-часовым световым днем.

Первичный фитохимический скрининг асептических растений. На растениях *O. basilicum* сортов Любимчик, Василиск (зеленолистные) и Фиолетовый бархат (фиолетоволиственный), культивируе-

мых на МС-средах, содержащих минеральные соли в концентрации 1 нормы или ½ нормы, был проведен первичный фитохимический скрининг по таким показателям как: танины [5], флавоноиды (с 10% NaOH и с 10% ацетатом свинца) [6], сапонины [5], алкалоиды (тест Майера, тест Драгендорфа) [6, 7], терпеноиды и стеролы (реакция Сальковского) [8], восстанавливающие сахара [9], протеины (биуретовая проба) [9], гликозиды (реакция Келлера–Килиани) [6].

Определение суммарного содержания фенольных соединений (ССФС) в микроклонах и каллусной культуре. Количественный анализ ССФС в микроклонах и каллусных культурах проводили на свежесобранном материале (сорта Любимчик, Василиск, Фиолетовый бархат). Свежую растительную массу или каллус измельчали в фарфоровой ступке с добавлением этилового спирта. После измельчения экстракт переливали в стеклянные пробирки и ставили на роторный шейкер на 1 ч. По прошествии этого времени экстракт фильтровали с помощью бумажных фильтров. К полученному отфильтрованному экстракту объемом 0.25 мл добавляли 3 мл дистиллированной воды, 0.25 мл реактива Фолина–Дениса. После чего ждали 3 мин, затем добавляли 0.5 мл насыщенного раствора гидрокарбонат натрия (8%) и 1 мл дистиллированной воды. ССФС определяли спектрофотометрически спустя 1 ч при длине волны 765 нм [10, 11]. Эксперимент осуществляли в 3 повторностях. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

Определение суммарного содержания флавоноидов в растениях и каллусе *O. basilicum*. Свежую растительную массу или каллус (сорта Любимчик, Василиск, Фиолетовый бархат) измельчали в фарфоровой ступке с добавлением спирта. После измельчения экстракт переливали в стеклянные пробирки и ставили на роторный шейкер на 1 ч. По истечению этого времени экстракт фильтровали с помощью бумажных фильтров. В пробирку наливали 1.5 мл полученного экстракта, добавляли 75 мкл 10% $AlCl_3$ (спиртовой) и 75 мкл 1М CH_3COOK (водный), после этого приливали 2.1 мл дистиллированной воды. Через 30 мин на спектрофотометре производили измерение оптической плотности при длине волны 415 нм. Эксперимент осуществляли в 3 повторностях. Калибровочный график строили по кверцетину.

Суммарное содержание флавоноидов (C , мг/г) в пересчете на кверцетин определяли по формуле [12, 13]:

$$C = \frac{RV \times 0.001}{m}, \quad (1)$$

где R — значение, полученное согласно калибровочной кривой, мкг/мл; V — объем экстракта, мл;

m — масса растительного образца, используемого при экстракции, г.

Влияние наночастиц (НЧ) феррата цинка на накопление вторичных метаболитов в каллусной культуре. Каллус, полученный из растительных эксплантов (сорт Фиолетовый бархат), выращивали на МС-среде с добавлением различных концентраций НЧ феррата цинка, полученных ранее методом “зеленого” синтеза на основе экстракта петрушки. НЧ предварительно обрабатывали ультразвуком в течение 4 ч и добавляли в состав МС-среды перед автоклавированием в концентрациях 12.5, 25 и 50 мкг/л. После автоклавирования и перед разливом МС-среды по чашкам Петри проводили ее обработку ультразвуком в течение 2 ч. Контролем служила питательная среда без добавления НЧ. Базовая МС-среда содержала 2,4-Д в концентрации 2 мг/л. Эксперимент проводился в 3-кратной повторности.

В конце цикла выращивания (30 сут.) определяли сухую и сырую биомассу, жизнеспособность (окрашивание клеток синькой Эванса в камере Горяева, подсчет мертвых и живых клеток), а также индекс роста (I), который рассчитывали по следующей формуле:

$$I = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \quad (2)$$

где W_0 — начальная масса каллуса, г; W_t — масса каллуса в конце цикла выращивания, г.

Определение фенольных соединений по вариантам проводили также в конце цикла выращивания (30 сут.) по методикам, описанным выше.

Статистическая обработка данных. Средние значения всех данных были рассчитаны с использованием Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США). В таблицах представлены средние арифметические значения и доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом работ было получение хорошо растущей стерильной культуры *O. basilicum*. В качестве стерилизующего агента применяли NaOCl в концентрации 5.0% и $HgCl_2$ в концентрации 0.1%. Семена *O. basilicum* проращивали на безгормональной МС-среде в чашках Петри в условиях световой комнаты. Контролем служил вариант нестерильного прорастания семян на фильтровальной бумаге в чашках Петри. Экспериментально установлено, что прорастание семян начиналось на 5 сут., а на 14 сут. формировались полноценные проростки. Данные по всхожести семян приведены в табл. 1. Последующее культивирование проростков на МС-среде в пластиковых контейнерах объемом 500 мл приводило к появлению первых настоящих листьев и формированию растений правильной морфологии.

Таблица 1. Всхожесть семян *Ocimum basilicum* при различных режимах стерилизации

Сорт	Режим стерилизации				Контроль
	NaOCl 10 мин	NaOCl 15 мин	HgCl ₂ 5 мин	HgCl ₂ 10 мин	
Любимчик	80.0 ± 6.2	80.0 ± 11.3	80.0 ± 16.0	80.0 ± 11.3	84.7...96.0
Василиск	88.0 ± 11.4	100.0	82.0 ± 13.0	86.0 ± 10.0	83.8...94.0
Фиолетовый бархат	77.5 ± 4.9	82.0...94.0	78.7...96.0	91.2...99.0	80.0 ± 8.8

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 50$.

Как следует из табл. 1, различий между всхожестью у всех трех сортов в нестерильных условиях не обнаружено. При этом для сорта Василиск предпочтительной была стерилизация 5% раствором гипохлорита натрия в течение 15 мин, для сорта Фиолетовый бархат — 0.1% раствором хлорида ртути(II) в течение 10 мин, для сорта Любимчик предпочтений нет.

Клональное микроразмножение сортов *O. basilicum*. Асептические растения *O. basilicum* различных сортов в возрасте 10 нед. черенковали и помещали на питательные МС-среды, содержащие минеральные соли в концентрации 1 нормы или ½ нормы без добавления фитогормонов и регуляторов роста или с добавлением 0.5 мг/л ИУК, НУК или ИМК. Экспериментально установлено, что минеральный и гормональный состав питательной среды оказывал существенное влияние на морфометрические показатели исследуемых сортов базилика (табл. 2).

Установлено, что наибольшая высота была у растений сортов Любимчик и Василиск, которые формировались на МС-среде с добавлением 0.5 мг/л НУК, тогда как у сорта Фиолетовый бархат достоверные различия между вариантами отсутствовали. В случае с сортом Любимчик данные по высоте растений, сформировавшихся на МС-среде с добавлением 0.5 мг/л ИУК не были получены из-за развившегося со 2-й недели культивирования некроза и последующей гибели растений. Культивирование сорта Василиск на ½ МС-средах с добавлением 0.5 мг/л ИМК, ИУК или НУК, а также МС-среде с 0.5 мг/л ИУК также приводило со 2-й недели культивирования к некрозам, что вызывало гибель растений. Эксперименты по клональному микроразмножению растений сорта Фиолетовый бархат на МС-средах с добавлением НУК не проводились, так как во время предварительного опыта было установлено, что НУК индуцировал у данного сорта базилика сильный каллусогенез без увеличения высоты побега и количества листьев.

Относительно количества образовавшихся настоящих листьев также были отмечены сортовые различия (табл. 2). У сорта Любимчик наибольшее количество листьев формировалось на МС-средах с

0.5 мг/л НУК и ½ МС с 0.5 мг/л ИУК; у сорта Василиск растения на МС-средах с 0.5 мг/л ИМК (НУК) превосходили контроль 2 (вариант с ½ нормы солей МС-среды), однако полноценные результаты не были получены из-за некрозов при культивировании на большинстве вариантов питательных сред.

Частота корнеобразования была высокой у всех изучаемых сортов на большинстве вариантов питательных сред (табл. 2). В 100% случаев растения сорта Фиолетовый бархат образовывали корни (за исключением вариантов ½ нормы солей МС-среды с 0.5 мг/л НУК, которые приводили к каллусогенезу, а также МС-среды с 0.5 мг/л ИМК, когда частота корнеобразования снижалась до 79%). У сорта Василиск наибольшую частоту корнеобразования отмечали на МС-среде с НУК, а у сорта Любимчик на половине вариантов частота корнеобразования превышала 90%.

Клональное микроразмножение видовых растений *O. basilicum* зарубежных *ex situ* популяций. Асептические видовые растения, полученные из 4 европейских ботанических садов (Польша, Бельгия, Италия, Германия), в возрасте 1 месяца разделяли на черенки и помещали на МС-среду без добавления фитогормонов (контроль) и с добавлением веществ ауксиновой природы — 1 мг/л ИУК или ИМК. На 42 сут. учитывали три морфологических показателя: высоту растений, количество листьев, частоту корнеобразования (табл. 3). Установлено, что по высоте растений существенных различий между вариантами сред и между образцами зафиксировано не было. Различия по количеству листьев между образцами в пределах одной питательной среды были незначительны. По количеству листьев в пределах каждого образца на разных питательных средах различия были незначительны, за исключением образца Poland, где достоверно большее количество листьев было отмечено на МС-среде с 1 мг/л ИУК. Наибольшая эффективность корнеобразования у всех образцов была отмечена на МС-среде с 1 мг/л ИМК.

Индукция каллусогенеза и органогенеза *O. basilicum*. Изучение влияния гормонального состава питательной среды на эффективность каллусогенеза и органогенеза проводили на различных ти-

Таблица 2. Морфометрические показатели асептических сортов растений *Ocimum basilicum* в зависимости от состава питательной среды

Состав питательной среды	Сорт		
	Любимчик	Василиск	Фиолетовый бархат
Высота растения, см			
МС (контроль 1)	1.90 ± 0.46	Некроз	4.93 ± 1.33
МС + 0.5 мг/л ИУК	Некроз	Некроз	4.65 ± 0.68
МС + 0.5 мг/л ИМК	3.80 ± 0.69	2.10 ± 0.31	3.58 ± 0.71
МС + 0.5 мг/л НУК	6.45 ± 0.83	3.23 ± 0.22	Каллусогенез
½ МС (контроль 2)	4.44 ± 0.67	2.47 ± 0.35	4.56 ± 0.70
½ МС + 0.5 мг/л ИУК	3.06 ± 0.72	Некроз	4.56 ± 0.75
½ МС + 0.5 мг/л ИМК	3.58 ± 0.51	Некроз	3.99 ± 0.11
½ МС + 0.5 мг/л НУК	5.50 ± 0.94	Некроз	Каллусогенез
Количество листьев, шт.			
МС (контроль 1)	9.82 ± 2.51	Некроз	6.43 ± 0.73
МС + 0.5 мг/л ИУК	Некроз	Некроз	5.90 ± 0.83
МС + 0.5 мг/л ИМК	11.00 ± 1.54	16.00 ± 3.92	7.47 ± 1.42
МС + 0.5 мг/л НУК	19.55 ± 3.48	22.00 ± 2.35	Каллусогенез
½ МС (контроль 2)	10.56 ± 2.19	9.68 ± 1.84	9.00 ± 0.74
½ МС + 0.5 мг/л ИУК	15.89 ± 5.91	Некроз	5.75 ± 0.79
½ МС + 0.5 мг/л ИМК	8.56 ± 0.89	Некроз	11.13 ± 1.95
½ МС + 0.5 мг/л НУК	9.10 ± 0.97	Некроз	Каллусогенез
Частота корнеобразования, %			
МС (контроль 1)	35	Некроз	100
МС + 0.5 мг/л ИУК	Некроз	Некроз	100
МС + 0.5 мг/л ИМК	85	73	79
МС + 0.5 мг/л НУК	100	95	Каллусогенез
½ МС (контроль 2)	89	32	100
½ МС + 0.5 мг/л ИУК	22	Некроз	100
½ МС + 0.5 мг/л ИМК	94	Некроз	100
½ МС + 0.5 мг/л НУК	95	Некроз	Каллусогенез

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы по 30 растениям.

пах экспланта (сегменты семядольных листьев, гипокотили, сегменты листовой пластинки, сегменты междоузлий, узлы) на МС-средах без добавления фитогормонов и регуляторов роста (контроль), а также с добавлением только ауксинов (0.5 мг/л ИУК, 2 мг/л 2,4-Д), только цитокининов (1 мг/л БАП) или сочетания ауксинового и цитокининового компонентов (3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК).

Экспериментально установлено, что у зеленолистных сортов Любимчик и Василиск на питательных средах, содержащих БАП, не удалось получить каллусной ткани (табл. 4). На МС-среде с 0.5 мг/л ИУК каллус образовывался на всех типах экспланта, однако наибольшую частоту каллусогенеза отмечали на листовых эксплантах — 33 и

44% соответственно, а на МС-среде с 2 мг/л 2,4-Д — 88 и 100% соответственно. При измерении содержания сухого вещества в каллусе значения у обоих сортов находилось в диапазоне от 4.6 до 7.0%.

У фиолетоволиственного сорта Фиолетовый бархат каллусную ткань удалось получить на всех типах экспланта на различных питательных средах (табл. 4). В частности, 100% частота каллусогенеза была отмечена на листовых эксплантах на МС-среде с добавлением 3 мг/л БАП и 0.3 мг/л ИУК, на сегментах междоузлий и узлах — на МС-среде с 2 мг/л 2,4-Д и МС-среде с 3 мг/л БАП и 0.3 мг/л ИУК, на семядольных листьях и гипокотилеях — на МС-среде с 2 мг/л 2,4-Д. Содержание сухого вещества находилось в диапазоне от 3.8 до 4.6%.

Таблица 3. Морфометрические показатели асептических видовых растений *Ocimum basilicum* на питательных средах различного гормонального состава

Вариант среды	Образец <i>O. basilicum</i>			
	Poland	Italy	Belgium	Germany
Высота растений, см				
МС (контроль)	4.5 ± 0.5	2.9 ± 1.5	3.0 ± 0.7	4.1 ± 0.7
МС + 1 мг/л ИУК	4.9 ± 2.9	3.1 ± 1.5	2.7 ± 0.3	4.8 ± 1.0
МС + 1 мг/л ИМК	4.3 ± 2.0	2.6 ± 0.9	2.7 ± 0.9	5.2 ± 1.2
Количество листьев, шт.				
МС (контроль)	6.5 ± 0.5	7.0 ± 2.6	8.8 ± 0.2	7.2 ± 0.7
МС + 1 мг/л ИУК	9.9 ± 1.9	9.2 ± 1.2	9.1 ± 3.9	6.8 ± 1.0
МС + 1 мг/л ИМК	5.4 ± 2.0	7.9 ± 1.8	7.1 ± 1.4	7.7 ± 0.9
Частота корнеобразования, %				
МС (контроль)	31	37	33	22
МС + 1 мг/л ИУК	27	36	25	25
МС + 1 мг/л ИМК	98	73	84	88

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы по 30 растениям.

Данные по корневому органогенезу представлены в табл. 5. Для сорта Любимчик удалось получить 100% корневой органогенез на узловых эксплантах при выращивании на МС-среде с 1 мг/л БАП, на гипокотильных эксплантах — на МС-среде с 0.5 мг/л ИУК. Частота корневого органогенеза у сорта Василиск была значительно ниже — максимальная частота была получена на листовых эксплантах на МС-среде с 0.5 мг/л ИУК, тогда как у сорта Фиолетовый бархат корневой органогенез проходил с достаточно высокой частотой (выше 70%) на всех типах экспланта.

Первичный фитохимический скрининг асептических растений. На растениях *O. basilicum* сортов Любимчик, Василиск (зеленолистные) и Фиолетовый бархат (фиолетоволиственный) был проведен первичный фитохимический скрининг по стандартным методикам. Как следует из табл. 6, между двумя вариантами минерального состава питательной среды (МС, ½ МС), как и между сортами не наблюдалось различий по выявленным группам метаболитов.

Определение суммарного содержания фенольных соединений (ССФС) в микроклонах и каллусной культуре. Количественный анализ ССФС проводили на асептических растениях трех сортов базилика — Любимчик, Василиск и Фиолетовый бархат (табл. 7). Установлено, что минеральный состав питательной среды не оказывал достоверного влияния на ССФС в растениях, однако были выявлены различия между сортами. Так, в зеленолистных сортах Любимчик и Василиск ССФС было достоверно меньше, по сравнению с фиолетоволиственным сортом Фиолетовый бархат.

В следующей серии экспериментов представляло интерес определить фенольные соединения в хорошо пролиферирующей каллусной ткани, культивируемой на МС-среде, содержащей 2,4-Д в концентрации 1, 2 и 3 мг/л, а также на МС-среде с 3 мг/л БАП и 0.3 мг/л ИУК. Для этого были выбраны сорта Любимчик (зеленолиственный) и Фиолетовый бархат (фиолетоволиственный), для которых была получена хорошо пролиферирующая каллусная ткань. В табл. 8 представлено ССФС в каллусе *O. basilicum*, культивируемом на МС-среде с различным гормональным составом. Для изучаемых сортов были установлены некоторые закономерности по ССФС в каллусной ткани, полученной из стеблевых и листовых эксплантов: наибольшее количество ССФС отмечено в каллусной ткани, полученной из листовых эксплантов; концентрация 2,4-Д не оказывает существенного влияния на ССФС; накопление фенольных соединений у фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат было в 2 раза выше, чем у зеленолистного сорта Любимчик; при использовании МС-среды, содержащей БАП (3 мг/л) и ИУК (0.3 мг/л) ССФС у сорта Фиолетовый бархат превышало показатели на МС-средах с добавлением 2,4-Д.

В табл. 9 приведены результаты по содержанию флавоноидов в каллусных культурах *O. basilicum*, культивируемых на МС-среде с различным гормональным составом. Установленные закономерности по содержанию флавоноидов были аналогичны закономерностям по ССФС.

Таким образом, ССФС в каллусной ткани снизилось по сравнению с микроклонами у обоих

Таблица 4. Частота каллусогенеза сортов *Ocimum basilicum* на различных типах экспланта при варьировании гормонального состава питательных сред

Гормональный состав МС-среды	Частота каллусогенеза, %		
	сорт Любимчик	сорт Василиск	сорт Фиолетовый бархат
Листья			
2 мг/л 2,4-Д	76.8...99.2	100.0	76.0...96.0
0.5 мг/л ИУК	33.0 ± 4.6	44.0 ± 9.0	0
1 мг/л БАП	0	0	74.0 ± 10.0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	100.0
Междоузлия			
2 мг/л 2,4-Д	76.4 ± 6.4	0	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	0	8.1...15.9
1 мг/л БАП	0	0	0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	100.0
Узлы			
2 мг/л 2,4-Д	80.0 ± 6.8	70.0 ± 9.6	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	0	0
1 мг/л БАП	0	0	0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	100.0
Семядольные листья			
2 мг/л 2,4-Д	40.6 ± 13.8	0	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	48.4 ± 10.0	0
1 мг/л БАП	0	0	0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	0
Гипокотили			
2 мг/л 2,4-Д	0	0	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	0	0
1 мг/л БАП	0	0	7.0...27.0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	0

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 50$.

Таблица 5. Эффективность корневого органогенеза *Ocimum basilicum* на различных питательных средах на разных типах экспланта

Сорт	Тип экспланта	Состав питательной среды	Частота корневого органогенеза, %
Любимчик	Узлы	МС + 1 мг/л БАП	100.0
	Гипокотили	МС + 0.5 мг/л ИУК	100.0
	Семядольные листья	МС + 0.5 мг/л ИУК	73.0 ± 3.8
Василиск	Узлы	МС + 0.5 мг/л ИУК	20.0 ± 4.6
	Листья	МС + 0.5 мг/л ИУК	53.0 ± 13.6
Фиолетовый бархат	Междоузлия	МС + 0.5 мг/л ИУК	70.0 ± 9.4
	Семядольные листья	МС + 0.5 мг/л ИУК	85.0...95.0
	Гипокотили	МС + 0.5 мг/л ИУК	100.0
	Семядольные листья	МС + 3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	80.0 ± 11.2
	Гипокотили	МС + 3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	100.0

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 50$.

Таблица 6. Результаты фитохимического скрининга асептических растений сортов *Ocimum basilicum*

Среда	Сорт	Танины	Флавоноиды (с 10% NaOH)	Флавоноиды (с 10% ацетатом свинца)	Сапонины	Алкалоиды (тест Майера)	Алкалоиды (тест Драгендорфа)	Терпеноиды и стеролы (реакция Сальковского)	Восстанавливающие сахара	Протеины (Биуретовая проба)	Гликозиды (Реакция Келлера–Килиани)
МС	Любимчик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Василиск	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Фиолетовый бархат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
½ МС	Любимчик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Василиск	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Фиолетовый бархат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 7. Общее содержание фенольных соединений в растениях сортов *Ocimum basilicum* на питательных средах различного минерального состава

Минеральный состав питательной среды	Сорт	мг/г сырой массы в пересчете на галловую кислоту
МС	Любимчик	5.3 ± 0.2
	Василиск	5.9 ± 0.4
	Фиолетовый бархат	7.1 ± 0.4
½ МС	Любимчик	5.5 ± 0.4
	Василиск	6.1 ± 0.3
	Фиолетовый бархат	7.3 ± 0.5

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

Таблица 8. Общее содержание фенольных соединений в каллусной ткани *Ocimum basilicum*, культивируемой на МС-среде с различным гормональным составом

Гормональный состав питательной среды	мг/г сырой массы в пересчете на галловую кислоту			
	сорт Любимчик		сорт Фиолетовый бархат	
	листья	стебли	листья	стебли
1 мг/л 2,4-Д	1.23 ± 0.94	0.68 ± 0.29	2.49 ± 0.35	1.26 ± 0.12
2 мг/л 2,4-Д	1.44 ± 0.36	0.74 ± 0.08	2.51 ± 0.18	1.32 ± 0.06
3 мг/л 2,4-Д	1.40 ± 0.56	0.72 ± 0.43	2.26 ± 0.29	1.29 ± 0.28
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	1.62 ± 0.46	1.09 ± 0.28	2.87 ± 0.32	1.48 ± 0.12

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

Таблица 9. Суммарное содержание флавоноидов в каллусах *Ocimum basilicum*, культивируемых на МС-среде с различным гормональным составом

Гормональный состав питательной среды	мг/г сырой массы в пересчете на кверцетин			
	сорт Любимчик		сорт Фиолетовый бархат	
	листья	стебли	листья	стебли
1 мг/л 2,4-Д	0.31 ± 0.18	0.14 ± 0.09	0.35 ± 0.21	0.15 ± 0.08
2 мг/л 2,4-Д	0.26 ± 0.18	0.17 ± 0.06	0.36 ± 0.24	0.19 ± 0.09
3 мг/л 2,4-Д	0.28 ± 0.19	0.15 ± 0.10	0.25 ± 0.18	0.17 ± 0.11
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0.38 ± 0.12	0.18 ± 0.07	0.58 ± 0.18	0.29 ± 0.08

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

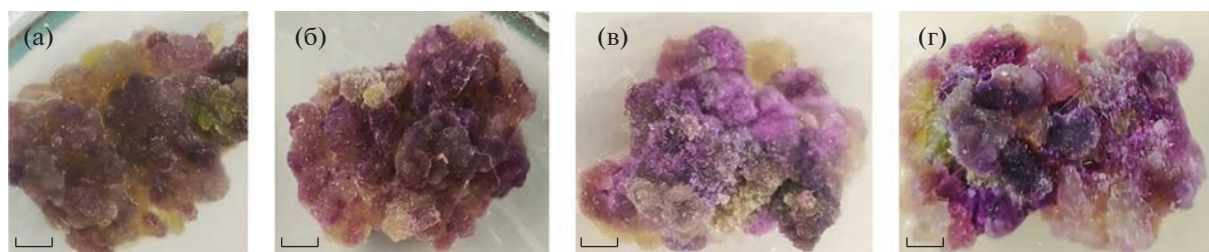


Рис. 1. Каллусная ткань *Ocimum basilicum* на МС-среде, содержащей наночастицы феррата цинка (мкг/л): а – 0 (контроль), б – 12.5, в – 25, г – 50. Бар – 0.3 см.

сортов, однако тенденция к превышению данного показателя у фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат над сортом Любимчик сохранилась. При этом культивирование каллуса на МС-среде с добавлением БАП и ИУК приводило к повышенным показателям ССФС и суммарного содержания флавоноидов по сравнению с МС-средой с добавлением 2,4-Д.

Влияние наночастиц (НЧ) феррата цинка на накопление вторичных метаболитов в каллусной культуре. Исследования проводили на каллусной культуре, полученной из стеблевых эксплантов сорта Фиолетовый бархат на МС-среде с добавлением БАП (3 мг/л) и ИУК (0.3 мг/л), а также различных концентраций НЧ феррата цинка (12.5, 25 и 50 мкг/л). Контролем служила МС-среда без добавления НЧ. Для характеристики каллусной ткани использовали такой показатель, как индекс роста, рассчитанный по биомассе каллусной ткани в начале и конце цикла выращивания. Первоначальный вес каллусной ткани во всех вариантах составлял 0.35 г. Полученные данные представлены в табл. 10. В результате проведенных исследований установлено, что добавление в МС-среду 25 мкг/л НЧ приводило к существенному увеличению сырой биомассы каллусной ткани, по сравнению с концентрациями 12.5 и 50 мкг/л. В варианте с 25 мкг/л НЧ индекс роста каллусной ткани был наибольшим и составил 3.55. При увеличении концентрации НЧ до 50 мкг/л отмечено снижение индекса роста, что свидетельствует об ингибирующем действии НЧ на пролиферативную активность дедифференцированных клеток.

Визуальные наблюдения, а также изучение каллусной ткани на временных препаратах пока-

зали, что наличие в составе питательной среды НЧ приводило к формированию каллусной ткани разной плотности и имеющей фиолетовый цвет, при этом оттенок зависел от концентрации НЧ (рис. 1). В контрольном варианте каллусная ткань была средней плотности, имела темно-фиолетовый цвет, состояла из гетерогенных по форме и размеру паренхимоподобных клеток, как правило, вытянутой формы с крупной вакуолью. В опытных вариантах, с увеличением концентрации НЧ феррата цинка в МС-среде, плотность каллусной ткани возрастала, а цвет изменялся от темно-фиолетового до светло-фиолетового (рис. 1). В этих вариантах каллусная ткань состояла из гетерогенных по форме и размеру паренхимоподобных клеток с крупной вакуолью. Каллусные клетки на МС-средах, дополненных НЧ феррата цинка, имели больший размер по сравнению с контрольным вариантом.

Изучение влияния НЧ феррата цинка на накопление фенольных соединений в каллусных клетках базилика (сорт Фиолетовый бархат) выявило зависимость накопления ССФС и флавоноидов от концентрации НЧ в МС-среде. Установлено, что увеличение концентрации НЧ приводило к снижению величины этих показателей (табл. 11). Однако достоверных различий не было обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

История культуры тканей и клеток лекарственных растений насчитывает не одно десятилетие [14–19]. Эксперименты в этой области имеют как фундаментальное, так и прикладное значе-

Таблица 10. Показатели каллусной культуры при культивировании на МС-среде, содержащей БАП (3 мг/л), ИУК (0.3 мг/л) и различные концентрации наночастиц (НЧ) феррата цинка

НЧ, мкг/л	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г	Индекс роста
0 (контроль)	1.27 ± 0.02	0.08 ± 0.02	2.85
12.5	1.30 ± 0.03	0.07 ± 0.04	2.94
25	1.50 ± 0.06	0.08 ± 0.02	3.55
50	1.02 ± 0.09	0.05 ± 0.03	2.09

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 20$.

Таблица 11. Суммарное содержание фенольных соединений (ССФС) и флавоноидов в каллусах *Ocimum basilicum*, культивируемых на МС-среде с добавлением различных концентраций наночастиц (НЧ) феррата цинка

НЧ, мкг/л	ССФС, мг/г сырой массы в пересчете на галловую кислоту	Суммарное содержание флавоноидов, мг/г сырой массы в пересчете на кверцетин
0 (контроль)	2.87 ± 0.32	0.58 ± 0.18
12.5	2.72 ± 0.28	0.51 ± 0.11
25	2.48 ± 0.19	0.50 ± 0.14
50	2.44 ± 0.16	0.52 ± 0.13

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

ние. К фундаментальному значению можно отнести изучение биологии и физиологии изолированных тканей и клеток растений как модельных систем. Возможность строго контролировать все аспекты проведения экспериментов *in vitro* в отличие от полевых условий (*in vivo*), произрастания природных популяций в естественных (*in situ*) или новых (в ботанических садах, *ex situ*) условиях позволяет, варьируя определенные параметры, устанавливать четкие зависимости между изменениями внешних факторов и ответной реакцией тканей, клеток или микрорастений, определять механизмы регуляции физиологических процессов на уровне организма, ткани или клетки. К прикладному значению клеточной инженерии можно отнести сохранение редких и исчезающих видов растений, получение и размножение ценных генотипов (получение гаплоидов и диплоидов, преодоление про- и постгамной несовместимости, клональное микроразмножение, соматическая гибридизация, криосохранение), проведение клеточной селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды абиотической или биотической природы, получение ценных вторичных метаболитов, среди которых особое внимание заслуживают БАВ, в том числе активные фармацевтические ингредиенты. Изучение морфогенеза для понимания процессов химической регуляции роста и дифференциации растительных клеток раскрывает механизмы основных процессов, опираясь на теоретические положения цитологии, генетики, физиологии растений, биохимии, молекулярной биологии, морфологии, анатомии, эмбриологии и др., обогащая их, в свою очередь, новыми сведениями [20].

Представители рода *Ocimum* L. неоднократно становились объектами биотехнологии, прежде всего, это касается двух видов – базилик священный (*O. tenuiflorum*) и базилик душистый (*O. basilicum*). Нами были рассмотрены отечественные сорта базилика душистого – Любимчик, Василиск, Фиолетовый бархат.

В исследованиях по клональному микроразмножению *O. basilicum* ранее уже использовали варьирование минерального (МС или $\frac{1}{2}$ МС) и гормонального (прежде всего, содержания ауксинов – ИУК, НУК, ИМК) состава питательной

среды [21–23]. В соответствии с полученными нами данными по трем отечественным сортам можно дать следующие рекомендации: сорта Любимчик и Василиск (оба зеленолистные) предпочтительно выращивать на МС-среде с 0.5 мг/л НУК, поскольку в этом варианте обеспечивается наибольшая высота растения и количество листьев, наблюдается высокая укореняемость (более 95%). Для фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат можно рекомендовать питательные среды, включающие $\frac{1}{2}$ нормы солей МС-среды с/без добавления 0.5 мг/л ИМК. Среда такого состава обеспечивают наибольшее количество листьев при 100% укореняемости и формирование относительно высоких побегов. А для образцов *O. basilicum* из ботанических садов Польши и Италии предпочтительной являлась МС-среда с 1 мг/л ИУК, для образца из Бельгии – МС-среда без добавления фитогормонов и регуляторов роста, а для образца из Германии – МС-среда с 1 мг/л ИМК. Для индукции каллусогенеза часто используют добавление в состав питательной среды цитокининового и ауксинового компонента, например, БАП и ИУК [24–27]. В наших исследованиях этот вариант гормонального состава МС-среды был оптимальным для фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат. Для зеленолистных сортов Любимчик и Василиск оптимальным было добавление в МС-среду 2,4-Д. Листовые экспланты продемонстрировали больший потенциал к формированию каллуса, чем стеблевые, что также подтверждает результаты других авторов [26]. Добавление в МС-среду ИУК способствовало корневному органогенезу как в наших исследованиях, так и в исследованиях других ученых [28]. Отсутствие единых рекомендаций по режимам индукции каллусогенеза и органогенеза *Ocimum* spp. отражено и в специализированной литературе [21, 25, 26, 28].

Накопление фенольных соединений видов-тканеспецифично, что подтверждается более ранними исследованиями [29]. Показано, что в культуре *in vitro*, используя косвенную регуляцию с помощью варьирования минерального и гормонального состава питательной среды, можно добиться значительного повышения ССФС и индивидуальных фенольных соединений по сравне-

нию с растениями, выращенными в полевых условиях [30]. Наши ранние данные подтверждают результаты других исследований по положительному влиянию добавления в МС-среду БАП и ИУК на накопление фенольных соединений, в частности, флавоноидов [31].

Содержание той или иной группы первичных и вторичных метаболитов варьирует как *in vivo* и *in vitro*, так и между популяциями *in situ*. Так, Sanni с соавт. (2008) отмечают, что накопление сапонинов и алкалоидов в листьях растений базилика, собранных в ботаническом саду, высокое, тогда как флавоноидов, терпенов, стероидов среднее, а танины и сахара присутствуют в следовых количествах [32]. Во время первичного фитохимического скрининга во всех опытных вариантах нами было доказано присутствие всех искомым групп веществ (танинов, флавоноидов, сапонинов, гликозидов, алкалоидов, полифенолов), что подтверждает данные других авторов [33–40].

В нашей работе впервые было изучено влияние НЧ феррата цинка на рост биомассы каллуса различных сортов *O. basilicum*. Основываясь на полученных данных, для увеличения сырой биомассы и получения наибольшего индекса роста можно рекомендовать добавление в МС-среду 25 мкг/л НЧ феррата цинка. При этом увеличение концентрации НЧ приводило к снижению основных морфометрических показателей каллусной культуры. Механизм подобного действия НЧ феррата цинка еще нуждается в дополнительном изучении.

Результаты исследования подтверждают выдвинутую разными авторами гипотезу о способности микрорастений и каллусных клеток базилика накапливать основные первичные и вторичные метаболиты, а также возможность управления этим процессом с помощью биологических (минеральный и гормональный состав питательной среды) и физических (наночастицы) элиситоров.

Работа выполнена в рамках тематического плана-задания на выполнение научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева” по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2023 г., а также при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-746 от 13 мая 2022 г. (внутренний номер МК-3084.2022.1.4) о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета Российской Федерации в рамках гранта Президента Российской Федерации на государственную поддержку молодых российских ученых — кандидатов наук, докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Flora Online (WFO). <http://www.worldfloraonline.org> (дата обращения 29.08.2023).
2. Севрук И.А., Писарев Д.И., Новиков О.О., Алексеева К.А., Малютина А.Ю. Исследование состава эфирного масла базилика обыкновенного — *Ocimum basilicum* L. флоры Белгородской области // Научные результаты биомедицинских исследований. 2015. Т. 1. № 3. С. 97. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2015-1-3-97-103>
3. Писарев Д.И., Алексеева К.А., Новиков О.О., Корниенко И.В., Севрук И.А. Химическое изучение состава антоцианов травы *Ocimum basilicum* L. // Научные результаты биомедицинских исследований. 2015. Т. 1. № 4. С. 119. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2015-1-4-119-124>
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
5. Aiyegoro O.A., Okoh A.I. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC // *BMC Complemen. Altern. Med.* 2010. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-21>
6. Baghel P.S., Ray S. Preliminary phytochemical screening of certain aphrodisiac plants used in traditional system of medicine // *Int. J. Botany Stud.* 2017. V. 2. P. 33.
7. Sreevidya N., Mehrotra S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials // *J. AOAC Int.* 2003. V. 86. P. 1124. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.6.1124>
8. Obianime A.W., Uche F.I. The phytochemical screening and effects of methanolic extract of *Phyllanthus amarus* leaf on the biochemical parameters of male guinea pigs // *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 2008. V. 12. P. 73. <https://doi.org/10.4314/jasem.v11i4.55199>
9. Ruthiran P., Selvaraj C.I. Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Parkia timoriana* (DC.) Merr. // *Res. J. Biotech.* 2017. V. 12. P. 47.
10. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // *Am. J. Enol. Vitic.* 1965. V. 16. P. 144. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
11. Запроматов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой. М.: Наука, 1971. С. 185.
12. Chang C., Yang M., Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods // *J. Food Drug Anal.* 2002. V. 10. P. 178. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
13. Stanojević L., Stanković M., Nikolić V., Nikolić L., Ristić D., Čanadanovic-Brunet J., Tumbas V. Antioxidant activity

- and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts // *Sensors*. 2009. V. 9. P. 5702. <https://doi.org/10.3390/s90705702>
14. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 350 с.
 15. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. Пушино: Пушкинский НЦ, 1994. С. 7.
 16. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
 17. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.
 18. Носов А.М. Культура клеток высших растений — уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 837.
 19. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 609. <https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
 20. Kumar D.R., Kumar S.A. Plant biotechnology: importance of plant tissue culture, applications and advantages // *Eur. Academic Res.* 2015. V. III. Iss. 6. P. 6134.
 21. Siddique I., Anis M. An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. // *Acta Physiol. Plant.* 2008. V. 30. P. 493. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0146-6>
 22. Shahzad A., Faisal M., Ahmad N., Anis M., Alatar A., Hend A.A. An efficient system for *in vitro* multiplication of *Ocimum basilicum* through node culture // *Afr. J. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 6055. <https://doi.org/10.5897/AJB12.154>
 23. Verma S.K., Sahin G., Das A.K., Gurel E. *In vitro* plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. is accelerated by zinc sulfate // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 20. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9739-0>
 24. Dode L.B., Bobrowski V.L., Bolacel Braga E.J., Kömmling Seixas F., Wulff Schuch M. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) // *Acta Sci. Biol. Sci.* 2003. V. 25. P. 435.
 25. Begum F., Amin M.N., Azad M.A.K. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. // *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 2002. V. 12. P. 27.
 26. González-Sánchez M.I., Lee P.T., Guy R.H., Compton R.G. *In situ* detection of salicylate in *Ocimum basilicum* plant leaves via reverse iontophoresis // *Chem. Commun.* 2015. V. 51. P. 16534. <https://doi.org/10.1039/C5CC06909B>
 27. Тужикова М.О. Оценка роста каллусной культуры базилика обыкновенного // Актуальные проблемы биомедицины — 2021: Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. Санкт-Петербург, 2021. С. 287.
 28. Bhuvaneshwari K., Sathya B., Gokulanathan A., Jayanthi M., Girija S. Induction of *in vitro* roots from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. and *O. tenuiflorum* L. // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 2012. V. 13. P. 15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.136>
 29. Jiang X., Liu Y., Li W., Zhao L., Meng F., Wang Y., Tan H., Yang H., Wei C., Wan X., Gao L. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant [*Camellia sinensis*] // *PLoS ONE*. 2013. V. 8: e62315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062315>
 30. Bhuvaneshwari K., Gokulanathan A., Jayanthi M., Govindasamy V., Milella L., Lee S., Yang D.C., Girija S. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites? // *Food Chem.* 2016. V. 194. P. 55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.136>
 31. Nazir M., Tungmunthum D., Bose S., Drouet S., Garros L., Giglioli-Guivarc'h N., Abbasi B.H., Hano C. Differential production of phenylpropanoid metabolites in callus cultures of *Ocimum basilicum* L. with distinct *in vitro* antioxidant activities and *in vivo* protective effects against UV stress // *J. Agric Food Chem.* 2019. V. 67. P. 1847. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05647>
 32. Sanni S., Onyeyili P.A., Sanni F.S. Phytochemical analysis, elemental determination and some *in vitro* antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. leaf extracts // *Res. J. Phytochem.* 2008. V. 2. P. 77.
 33. Khair-ul-Bariyah S., Ahmed D., Ikram M. *Ocimum basilicum*: a review on phytochemical and pharmacological studies // *Pak. J. Chem.* 2012. V. 2. P. 78. <https://doi.org/10.15228/2012.v02.i02.p05>
 34. El-Beshbishy H.A., Bahashwan S.A. Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: an *in vitro* study // *Toxicol. Ind. Health.* 2012. V. 28. P. 42. <https://doi.org/10.1177/0748233711403193>
 35. Akoto C.O., Acheampong A., Boakye Y.D., Naazo A.A., Adomah D.H. Anti-inflammatory, antioxidant, and anthelmintic activities of *Ocimum basilicum* (Sweet Basil) fruits // *J. Chem.* 2020. V. 2020: 2153534. <https://doi.org/10.1155/2020/2153534>
 36. Marwat S.K., Khan M.S., Ghulam S., Anwar N., Mustafa G., Usman K. Phytochemical constituents and pharmacological activities of sweet Basil-*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) // *Asian J. Chem.* 2011. V. 23. P. 3773.
 37. Rubab S., Hussain I., Khan B.A., Unar A.A., Abbas K.A., Khichi Z.H., Khan M., Khan M., Rehman K.U., Khan H. Biomedical description of *Ocimum basilicum* L. // *J. Islamic Int. Med. Coll.* 2017. V. 12. P. 59.
 38. Shahrajabian M.H., Sun W., Cheng Q. Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review // *Int. J. Food Prop.* 2020. V. 23. P. 1961. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
 39. Lang E., Amelunxen F., Friedrich H., Horster H. Morphometrische Untersuchungen zur Bildung und Akkumulation von Laminaceengerbstoffen in *Ocimum basilicum* Zellkulturen // *Planta-Med.* 1978. V. 33. P. 281.
 40. Ambreen M., Mirza S.A. Evaluation of anti-inflammatory and wound healing potential of tannins isolated from leaf callus cultures of *Achyranthes aspera* and *Ocimum basilicum* // *Pak. J. Pharm. Sci.* 2020. V. 33. P. 361. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1524828>

УДК 581.1

НАКОПЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ И НАФТОХИНОНОВ В МОРФОГЕННЫХ КУЛЬТУРАХ ДВУХ ВИДОВ РОДА *Drosera*

© 2023 г. А. В. Моршнева^{а, б, *}, М. Т. Ханды^{а, б}, В. П. Григорчук^а,
Г. К. Чернодед^а, Т. Ю. Горпенченко^а

^аФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

^бДальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

*e-mail: morshneva.av@students.dvfu.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

Получена ризогенная культура *Drosera capensis* L. Методом ВЭЖХ-УФ-МС проведен сравнительный анализ влияния разных методов сушки на показатель выхода индивидуальных полифенолов и 1,4-нафтохинонов ризогенной культуры *D. capensis* L. с ранее полученной морфогенной длительно-растущей (более 15 лет) культурой *D. rotundifolia* L. В ризогенной культуре *D. capensis* L. впервые идентифицировано 6 соединений (мирицетин-3-*O*-β-глюкопиранозид, россоллизид, 3,3'-ди-*O*-метилэллаговой кислоты 4-*O*-β-D-глюкопиранозид, мирицетин, 3,3'-ди-*O*-метилэллаговая кислота, плюмбагин).

Ключевые слова: *Drosera capensis*, *Drosera rotundifolia*, галлат эпикатехина, морфогенные культуры, нафтохиноны, полифенолы, пробоподготовка, флавоноиды, эллаговая кислота

DOI: 10.31857/S0015330323600717, EDN: ZFGIDI

ВВЕДЕНИЕ

Рослянка (*Drosera* L.) является одним из крупнейших родов плотоядных растений из семейства росянковых (*Droseraceae*). Эти растения широко применяются в народной медицине, а их экстракты обладают антимикробными, противогрибковыми и противоопухолевыми свойствами [1, 2]. Считается, что биологическая активность *Drosera* обусловлена 1,4-нафтохинонами и флавоноидами [3].

Разные виды *Drosera* накапливают два основных нафтохинона — плюмбагин и 7-метилглюгон [4], и в небольших количествах — гидроксиплюмбагин-4-*O*-гликозида, дрозерон, гидроксидрозерон, дрозерон-5-гликозид, гидроксидрозерон-8-гликозид, россоллизид [3, 5–7]. Основными флавоноидами, обнаруженными в роде *Drosera*, являются кверцетин, гиперозид, кемпферол, мирицетин [8–10]. Еще одной группой вторичных метаболитов *Drosera* являются эллаготанины, в частности, продукт их разложения — эллаговая кислота [11]. Таким образом, род *Drosera* — богатый источник экономически ценных вторичных метаболитов. Однако, естественный ареал росянки под действием антропогенных факторов стремительно сокращается [12]. Получение хорошо растущей культуры клеток *Drosera* с высокими показателями синтеза биологически активных

веществ востребовано на рынке фармакологических субстанций [13].

Исследование вторичного метаболизма в целом растении весьма трудоемкий процесс, обусловленный долгим жизненным циклом растений, привязанностью к месту обитания, климату, зависимостью от погодных и других условий окружающей среды. Одним из эффективных способов в исследовании биохимических процессов и самих веществ является использование модельных систем. Для растений, одним из вариантов модельных систем является культура клеток, тканей и органов *in vitro*. Поэтому культура клеток росянки является не только источником ценных вторичных метаболитов, но и важным объектом в исследовании и в понимании вторичного метаболизма полифенолов и нафтохинонов. Различные природные модификации структур молекул определяют специфические свойства веществ. Способ извлечения этих веществ, применяемый растворитель и метод сушки растительной ткани в итоге могут негативно сказываться на составе вторичных метаболитов растительных тканей.

Цель данной работы — исследовать состав полифенолов и нафтохинонов в морфогенных культурах двух видов *D. rotundifolia* и *D. capensis* при различном способе высушивания исходного материала.

Таблица 1. Гормональный состав сред, использованных при получении и выращивании культуры клеток *D. capensis*

№ среды	1	2	3	4	5	6	7
Гормон и его концентрация в среде, мг/л	НУК 2/кин 1	НУК 2/кин 0.5	НУК 1/кин 0.5	НУК 2	НУК 2/БАП 1	НУК 2/БАП 0.5	НУК 1/БАП 0.5

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объектов исследования использовали две линии морфогенной культуры *D. rotundifolia* под обозначением “DR Green Dark”, “DR Green Light”, полученные в 2005 г. в лаборатории биотехнологии Биолого-почвенного института [14], и полученную в рамках настоящего исследования ризогенную культуру *in vitro* *D. capensis* под обозначением “DC Dark”.

Получение культур клеток *D. capensis*. В качестве эксплантов использовали листья растения *Drosera capensis* L. Листья промывали детергентом, затем теплой водой и стерилизовали 0.1% диоцидом в течение 5 мин. После стерилизации материал трехкратно отмывали в стерильной дистиллированной воде. Стерильные листья просушивали на стерильной фильтровальной бумаге и использовали в качестве эксплантов, помещая их на агаризованную питательную среду. Чашки Петри с первичным эксплантом культивировали в темноте при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажности $70 \pm 5\%$.

Для индукции каллусогенеза использовали МС-среду, приготовленную по стандартной прописи [15] с семью разными сочетаниями фитогормонов: α -нафтилуксусную кислоту (НУК), кинетин (кин) и 6-бензиламинопурин (БАП). Сочетания и концентрации гормонов в среде представлены в табл. 1.

Инициация образования каллуса произошла при замене регулятора роста на 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 1 мг/л.

После начала каллусогенеза объекты были перенесены на стандартную коллекционную среду W_0 (МС-среда со сниженным содержанием нитрата аммония NH_4NO_3 до 400 мг/л среды), используемую в институте (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН), с регуляторами роста НУК (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л).

Исследование ростовых характеристик полученной линии *D. capensis* и двух других исследуемых линий *D. rotundifolia* производили на основании данных сухого веса биомассы. Индекс роста определяли по формуле:

$$I = \frac{W_t - W_0}{W_0},$$

где W_0 — начальная масса культуры, г; W_t — масса культуры в конце цикла выращивания, г.

Условия культивирования. Культивирование проводили на среде W_0 с добавлением тиамина (В1) — 0.2 мг/л, пиридоксина (В6) — 0.5 мг/л, никотиновой кислоты (РР) — 0.5 мг/л, мезоинозитола — 100 мг/л, пептона — 100 мг/л, сахарозы — 25000 мг/л, агара — 6000 мг/л и гормонов НУК — 2.0 мг/л, БАП — 0.5 мг/л. Каллусы выращивали в колбах объемом 100 мл (33 мл питательной среды) в темноте (линии *D. capensis* “DC Dark”, *D. rotundifolia* “DR Green Dark”) при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и на свету (линия *D. rotundifolia* “DR Green Light”) при $25 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности $70 \pm 5\%$ и интенсивности освещения люминесцентными лампами (белый свет) 49 мкмоль/(с м²) в режиме 16/8 ч день/ночь, соответственно. Цикл выращивания составлял 30 сут. Для пересева использовали фрагменты каллуса с размером 0.8 см³.

Подготовка проб для фитохимического анализа. Для анализа биомассу подготовили двумя разными способами: высушивали в потоке теплого воздуха (+40°C) и измельчили с использованием жидкого азота (1 способ), высушивали в аппарате лиофильной сушки (2 способ). 50 мг измельченной биомассы экстрагировали 1 мл 80% метанола в течение 30 мин с использованием ультразвуковой бани. Экстракт выдерживали 12 ч без доступа света, супернатант фильтровали (0.45 мкм, Millipore, “Бедфорд”, США) и использовали для фитохимического анализа.

Фитохимический анализ. Для анализа вторичных метаболитов в биомассе морфогенных культур *D. rotundifolia* и *D. capensis* была использована аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ-МС). Экстракты анализировали с использованием хроматографа 1260 Infinity (“Agilent”, США) совмещенного с тандемным масс-спектрометром Bruker HCT ultra PTM Discovery System (“Bruker Daltonik”, GmbH, Германия). Разделение проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм, “Agilent”, США) термостатированной при 40°C. В качестве подвижной фазы использовали раствор муравьиной кислоты (0.1%) в деионизированной воде (раствор А) и ацетонитрил (раствор Б). Градиентное элюирование проводили со скоростью потока 0.2 мл/мин по следующей схеме: от 10% до 35% раствора Б за 40 мин, затем до 95% раствора Б до 50 мин и 95% раствора Б до 60 мин. УФ-спектры записывали в диапазоне λ 200–800 нм с использованием детектора на ди-

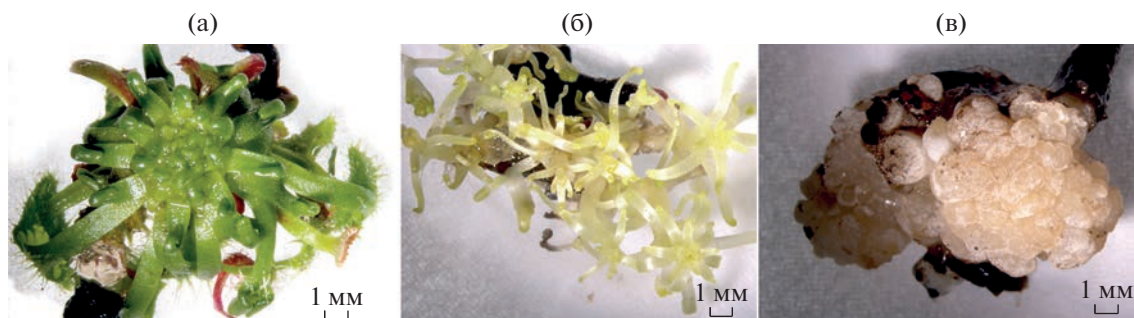


Рис. 1. Внешний вид линий морфогенных культур *D. rotundifolia* и *D. capensis*: (а) — линия “DR Green Light”; (б) — “DR Green Dark”; (в) — “DC Dark”. Масштаб 1:5.

одной матрице. Масс-спектрометрические данные для подтверждения идентификации определяемых компонентов получали в условиях ионизации электрораспыления и регистрации отрицательных ионов с диапазоном регистрируемых значений m/z 100–1000. Количественный анализ полифенолов производили при длине волны 265 нм, нафтохинонов — при 330 нм.

Статистический анализ данных. Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prism 8. Достоверность результатов была рассчитана с помощью t -теста, критерия Уилкоксона и U -критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение культур клеток *D. capensis*. На первых этапах работы с *D. capensis*, основываясь на литературных данных, для индукции каллусогенеза использовали агаризованную МС-среду с НУК и цитокининами [16, 17]. Культивирование эксплантов на этих средах в течение двух месяцев существенных результатов не дало. При повторных экспериментах, для индукции каллусогенеза регулятор роста поменяли на 2,4-Д. В результате проведенных экспериментов по влиянию различных регуляторов роста на каллусогенез было установлено, что первичная культура *D. capensis* формируется на среде, содержащей гормон 2,4-Д в концентрации 1 мг/мл. Первичный каллусогенез начинался непосредственно из листьев спустя пятнадцать дней культивирования с образованием побегов. Полученные каллусные культуры характеризовались светло-желтым цветом и твердой структурой. После переноса культур на среду W_0 НУК 2 мг/л, БАП 0.5 мг/л, на двадцатые сутки был сформирован твердый ризогенный каллус *in vitro* с плотной структурой (рис. 1в). На некоторых участках образовывались плотные перьевидные отростки белого цвета. На остальных вариантах используемых сред ростовые процессы не были выявлены. Полученная культура выращивается в течение 2 лет, за это время ее морфологическая

структура не менялась. Индекс роста полученной культуры *D. capensis* составляет 3.7. Индекс роста линий *D. rotundifolia* “DR Green Dark” “DR Green Light” равен 2.2 и 5.0, соответственно.

Фитохимическая характеристика морфогенных культур *Drosera*. В результате ВЭЖХ-УФ-МС анализа в исследуемых линиях идентифицировано двенадцать биологически-активных соединений — флавоноиды и их гликозиды (мирицетин-3- O - β -глюкопиранозид (два изомера), гиперозид, изокверцетин, мирицетин и кверцетин), производные эллаговой кислоты (гликопиранозид 3- O -метилэллаговой кислоты, 3,3'-ди- O -метилэллаговой кислоты 4- O - β -D-гликопиранозид, 3,3'-ди- O -метилэллаговой кислоты), галлат эпигаллокатехина и 1,4-нафтохиноны (россолизид и плюмбагин) (рис. 2). Идентификация соединений была произведена ранее и опубликована в нашей предыдущей работе [14].

В ризогенном каллусе *in vitro* *D. capensis* идентифицировано 6 основных соединений: мирицетин-3- O - β -глюкопиранозид, россолизид, 3,3'-ди- O -метилэллаговая кислота и ее 4- O - β -D-гликопиранозид, мирицетин, плюмбагин (рис. 2).

Сопоставление разных способов сушки и использования свежесобранной биомассы для количественного анализа полифенолов и 1,4-нафтохинонов выявило несколько различий (табл. 2). Первое, при разных методах сушки качественный состав полифенолов существенно не различался (за исключением галлата эпикатехина, который не был обнаружен при воздушной сушке в двух линиях), однако, количественное содержание при лиофильной сушке было выше (от 0.01 до 0.2 мкг/г сухого веса). Второе, 1,4-нафтохиноны лучше идентифицировались после воздушной сушки. Поскольку 1,4-нафтохиноны являются, наравне с флавоноидами, одними из важных целевых соединений *Drosera* определяющих биологическую активность экстрактов, для дальнейших расчетов и оценки продуктивности линий использовали результаты анализа экстрактов образцов после воздушной сушки.

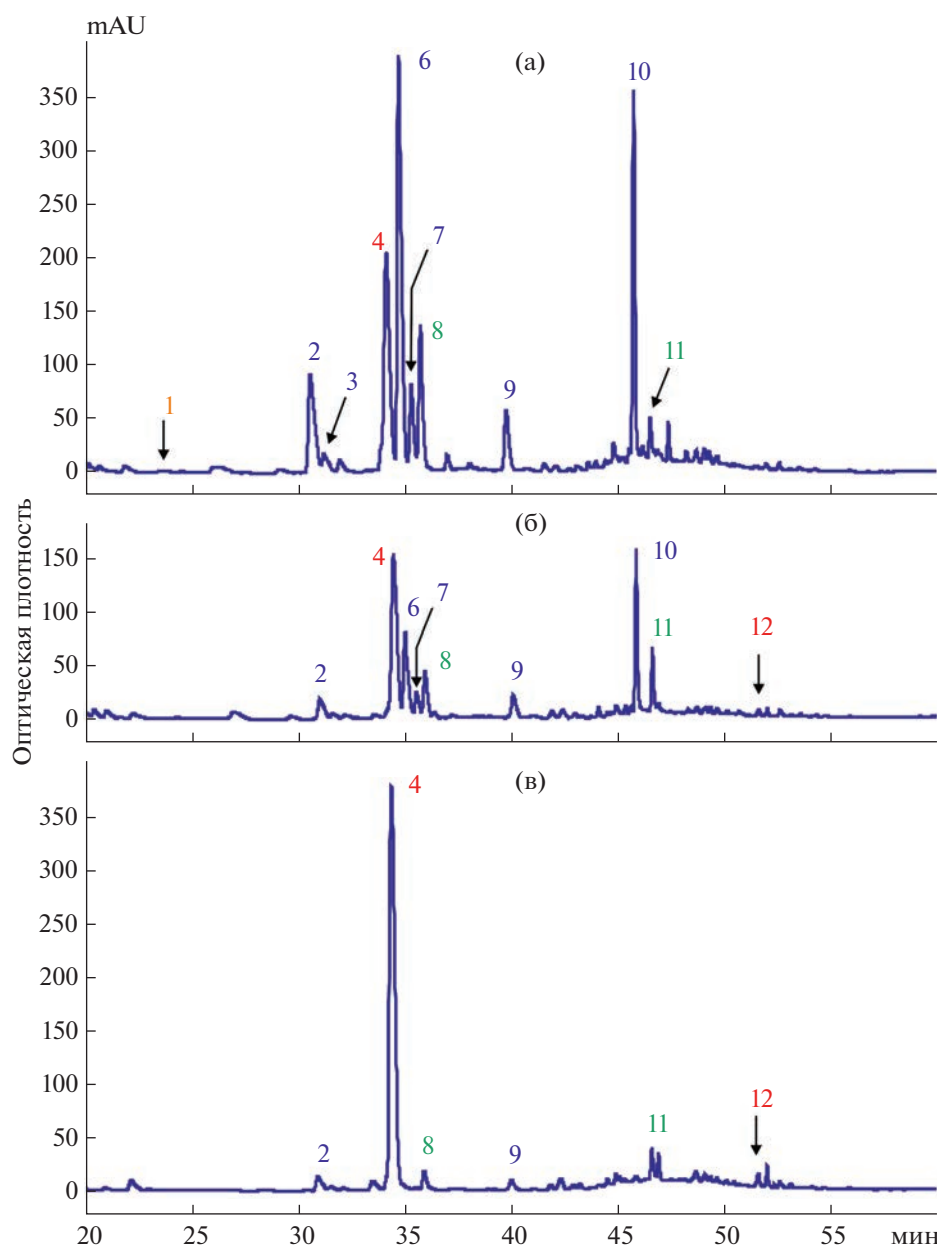


Рис. 2. Хроматографический профиль (ВЭЖХ, 330 нм) экстрактов из морфогенных каллусов *D. rotundifolia* и *D. capensis* после сушки теплым воздухом (+40°C): (а) – линия “DR Green Light”; (б) – “DR Green Dark”; (в) – “DC Dark”. Нумерация на хроматограмме соответствует номерам пиков из таблицы 2.

Количественный анализ полифенолов и нафтохинонов, содержащихся в культурах клеток двух видов растения рода *Drosera* – *D. rotundifolia* и *D. capensis* выявил существенные различия между линиями (табл. 2). Высокие показатели производительности полифенолов установлены для линии “DR Green Light”, в частности, по накоплению флавоноидов, они превышают в три раза аналогичные показатели в линии “DR Green Dark”, и в 20 раз – линии “DC Dark”. По показателям производных эллаговой кислоты в 1.5 раз – линии “DR Green Dark” и в 3 раза “DC

Dark”. По показателям накопления 1,4-нафтохинонов положительно отличилась полученная линия ризогенного каллуса *D. capensis* “DC Dark”. В этом случае, показатель плюмбагина в два раза превышает все линии “DR Green Dark”.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение новых культур клеток является неотъемлемым этапом большинства направлений исследований растительной биологии и биотехнологии. Особый интерес при этом представляют культуры клеток плотоядных растений, как ис-

Таблица 2. Количественное содержание вторичных метаболитов в экстрактах морфогенных культур *Drosera*, высушенных на воздухе, с помощью лиофильной сушки и из свежей ткани

Вид сушки		Воздушная сушка (+40°C)				Лиофильная сушка			
линия		“DR Green Light”	“DR Green Dark”	“DC Dark”	“DR Green Light”	“DR Green Dark”	“DC Dark”		
номер пика на хроматограмме		мкг/г сухого веса							
1	Галлат эпигаллокатехина	+	0	0	+	+	+	мкг/г сухого веса	
Флавоноиды									
2	Мирицетин-3- <i>O</i> -β-глюкопиранозид I	2.184	0.495	0.227	2.058	0.464	0.395		
3	Мирицетин-3- <i>O</i> -β-глюкопиранозид II	0.46	0	0	0.203	0	0		
6	Гиперозид	6.659	1.547	0	6.739	1.757	0		
7	Изокверцетин	1.182	0.225	0	1.391	0.457	0		
9	Мирицетин	1.037	0.505	0.256	1.198	0.496	0		
10	Кверцетин	3.589	1.694	0	4.065	1.729	0		
Производные эллаговой кислоты									
5	Гликопиранозид 3- <i>O</i> - метилэллаговой кислоты	0.567	0.156	0	0.771	0	0		
8	3,3'-ди- <i>O</i> - метилэллаговой кислоты 4- <i>O</i> -β-D- гликопиранозид	1.51	0.645	0.281	1.712	0.601	0.54		
11	3,3'-ди- <i>O</i> -метилэллаговая кислота	0.551	0.847	0.549	0.82	0.944	0.347		
Нафтохиноны									
4	Россолизид	+	+	+	+	+	0		
12	Плюмбагин	0	0.06	0.111	0	0.125	0		

Примечание. По U-критерию Манна–Уитни не обнаружено достоверной разницы в содержании индивидуальных соединений в образцах, высушенных лиофильно и в потоке теплого воздуха.

точники ценных вторичных метаболитов. Получение микроклонов и культивирование растений *Drosera* хорошо разработанная технология [17]. Однако, плантационное культивирование *D. rotundifolia* и *D. capensis* практически невозможно. Во-первых, растения сами по себе маленького размера 10–15 см в высоту, во-вторых, специфичная среда обитания — торфяные болота, площадей которых с каждым годом все меньше [12], а воссоздание среды обитания — затратное мероприятие. Полученная ранее нами стабильная длительно-растущая морфогенная культура *D. rotundifolia* дала основу для поиска новых систем для исследования вторичного метаболизма плотоядных растений. *D. capensis*, как близкородственного вида *D. rotundifolia* со схожим фитохимическим составом, могла бы стать новой сравнительной моделью.

Получить каллусную культуру *D. capensis* удалось с использованием гормона 2,4-Д из листьев интактного растения классическими методами. Индукция каллусогенеза является известным свойством 2,4-Д [18, 19]. Длительное выращивание на 2,4-Д оказалось невозможным из-за ингибирования ростовых процессов на втором пассаже. В результате произвели смену среды на стандартную коллекционную среду с фитогормонами НУК и БАП, которая привела к получению ризогенной культуры с высокими показателями роста (индекс роста не менее 5 в течение года). Полученный результат интересен тем, что при микроклональном размножении растений рода *Drosera* весьма проблематичным является индукция корнеобразования и, именно, укоренение растения [17, 20–22], а в нашем случае сразу происходит формирование ризогенной клеточной культуры. Использование данного соотношения гормонов может быть перспективным и для укоренения микроклонированных растений. В аналогичных условиях ранее была получена морфогенная клеточная культура *D. rotundifolia*, культивируемая длительное время (с 2005 г.) в темноте, однако, ткань развивалась преимущественно побегами [14]. При выращивании морфогенной клеточной культуры *D. rotundifolia* на свету повышались показатели накопления вторичных метаболитов — флавоноидов и 1,4-нафтохинонов, при этом показатели роста были выше, чем у тканей, выращиваемых в темноте. Свет является одним из наиболее важных факторов, влияющих на рост и выработку вторичных метаболитов растениями [23]. В исследовании о влиянии светодиодных источников света на *D. bermannii* было показано, что при белом светодиодном освещении увеличивалось количество плюмбагина в побегах относительно корней, но спустя две недели эффект прошел [24]. Напротив, в работе Wojciech с соавт. [25] о влиянии сине-красного света на фенольные соединения в семействе *Droseraceae* полагают, что

этот фактор не изменяет общего содержания фенолов, но влияет на накопление специфических фенолов и снижает содержание плюмбагина. На основании имеющихся данных можно заключить, что вопрос влияния света на жизнедеятельность росянки, в частности на накопление вторичных метаболитов, остается дискуссионным.

Исследование особенностей накопления и извлечения биологически активных вторичных метаболитов из культур клеток является важной прикладной и фундаментальной задачей современной биологии растений. В растениях *in vitro* *Drosera*, обнаружены флавоноиды: кверцетин, кверцетрин, изокверцетин, мирицетрин и др. в небольшом количестве в видах *D. rotundifolia*, *D. capensis*, а также *D. intermedia*, *D. spatulata* [21]. Кроме самих флавоноидов, в растениях находят их гликозилированные формы, наиболее распространенными из которых являются формы 3-*O*-глюкозида или 3-*O*-галактозида. Эти вещества распространены во многих видах растений. Например, у *D. madagascariensis* и *D. rotundifolia* было обнаружено, что кверцетин составляет около 2 и 0.49% сухого веса исследованных растений соответственно, тогда как количество флавонолгликозида — гиперозида (кверцетин 3-*O*-галактозид) составляло 3.75 и 6.36%, соответственно [26, 27]. Другое исследование *D. rotundifolia* также подтвердило эту тенденцию, выявив 0.17 и 2.89% сухого веса для кверцетина и гиперозида, соответственно [9]. В нашей работе наблюдается такая же закономерность (табл. 2). Количественное содержание флавоноидных гликозидов варьирует относительно литературных данных. Так, общее содержание веществ в среднем составляет от 5 до 10%, при этом среди флавоноидов обнаружены чаще всего: гиперозид, мирицетин-3-*O*-галактозид, изокверцитрин, кверцетин. В исследовании Paul A. Egan [3] показано, что в *D. rotundifolia*, кверцетин может быть обнаружен на уровне 6.40%, а кверцетин-3-*O*-галактозид — на уровнях, достигающих 6.36%. Большее количество флавоноидов и их гликозидов находится в листьях, стеблях и цветках растений, чем в корнях [17]. В нашей работе флавоноиды также преобладали в морфогенной культуре, состоящей из надземных побегов.

В литературных данных сообщается, что интактное растение *D. rotundifolia* богато флавоноидами, 1,4-нафтохинонами, эллаговой кислотой и ее производными [28]. Большинство из этих веществ были идентифицированы в исследуемых образцах. Их структурное разнообразие схоже описанному в литературе для интактных растений *D. rotundifolia* и количественно больше в образцах линии “DR Green Light” [28, 29]. В исследовании R. Caniato с соавт. [30] сообщается об отсутствии вариации соединений между корнями и надземными органами у диких популяций *D. ro-*

tundifolia, у видов *D. capensis* наблюдается заметная разница между содержанием нафтохинонов в корнях и побегах растений – в корнях большее содержание 7-метилглюкона, чем в побегах данного вида. Однако был проведен отдельный анализ подборки частей растений *D. capensis*, который показал, что самая большая концентрация 7-метилглюкона была обнаружена в цветках.

Выделение и биосинтез галлат эпигаллокатехина мало рассмотрен и обобщен в литературных данных о хищных растениях. Однако, это соединение является основным компонентом различных видов чая, содержащимся преимущественно в листьях и проявляющем значительную биоактивность, включая потенциальную противораковую и противовоспалительную [31]. Малая изученность биосинтеза и физиологических функций этого соединения у хищных растений может открыть новое направление для исследований.

В нашем исследовании содержание флавоноидных гликозидов, производных эллаговой кислоты и 1,4-нафтохинонов значительно не отличается, однако измельчение высушенного теплым воздухом материала в ступке более трудоемко, чем высушенного лиофилизацией.

Таким образом, исследуемые морфогенные культуры *D. rotundifolia* и *D. capensis* являются перспективными источниками возобновляемого сырья с высоким содержанием полифенолов и 1,4-нафтохинонов. При этом способ высушивания материала лишь незначительно влияет на выход исследуемых веществ.

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 121031000144-5) и при частичной поддержке Российской федеральной программы академического лидерства “Приоритет 2030” (№ 23-01-3.04.0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Didry N., Dubreuil L., Troin F., Pinkas M. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria // J. Ethnopharm. 1998. V. 60. P. 91. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00129-3)
2. Crowder A.A., Pearson M.C., Grubb P.J., Langlois P.H. *Drosera* L. // J. Ecol. 1990. V. 78. P. 233. <https://doi.org/10.2307/2261048>
3. Egan P.A., Kooy F. Phytochemistry of the carnivorous sundew genus *Drosera* (*Droseraceae*) – future perspectives and ethnopharmacological relevance // Chem. Biodiversity. 2013. V. 10. P. 1774. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200359>
4. Kämäräinen T., Uusitalo J., Jalonen J., Laine K., Hohtola A. Regional and habitat differences in 7-methylglucose content of Finnish *Drosera rotundifolia* // Phytochem. 2003. V. 63. P. 309. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00115-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00115-8)
5. Marczak L., Kawiak A., Lojewska E., Stobieck M. Secondary metabolites in *in vitro* cultured plants of the genus *Drosera* // Phytochem. Anal. 2005. V. 16. P. 143. <https://doi.org/10.1002/pca.833>
6. Budzianowski J., Skrzypczak L., Kukulczanka K. Phenolic compounds of *Drosera intermedia* and *D. spatulata* from *in vitro* cultures // Acta Hort. 1993. V. 330. P. 277. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.330.36>
7. Gu J.Q., Graf T.N., Lee D., Chai H.B., Mi Q., Kardono L.B.S., Setyowati F.M., Ismail R., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Swanson S.M., Kroll D.J., Falkinham J.O., et al. Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 1156. <https://doi.org/10.1021/np040027m>
8. Zehl M., Braunberger C., Conrad J., Crnogorac M., Krasteva S., Vogler B., Beifuss U., Krenn L. Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important *Drosera* species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS // Anal. Bioanal. Chem. 2011. V. 400. P. 2565. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4690-3>
9. Fukushima K., Nagai K., Hoshi Y., Masumoto S., Mikami I., Takahashi Y., Oike H., Kobori M. *Drosera rotundifolia* and *Drosera tokaiensis* suppress the activation of HMC-1 human mast cells // J. Ethnopharm. 2009. V. 125. P. 90. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.009>
10. Sprague-Piercy M.A., Bierma J.C., Crosby M.G. The droserasin 1 PSI: a membrane-interacting antimicrobial peptide from the carnivorous plant *Drosera capensis* // Biomolec. 2020. V. 10. P. 1069. <https://doi.org/10.3390/biom10071069>
11. Sharifi-Rad J., Quispe C., Castillo C.M.S., Caroca R., Lazo-Vélez M.A., Antonyak H., Polishchuk A., Lysiuk R., Oliinyk P., Masi L.D., Bontempo P., Martorell M., Daştan S.D., Rigano D., Wink M. et al. Ellagic acid: a review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential // Oxid. Med. Cell. Longevity. 2022. V. 2022. P. 24. <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>
12. Barthlott W., Hostert A., Kier G., Küper W., Kreft H., Mutke J., Rafiqpoor M.D., Sommer J.H. Geographic patterns of vascular plant diversity at continental to global scales // Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl., Abt. I. 2007. V. 61. P. 305. <https://doi.org/10.3112/erdkunde.2007.04.01>
13. Baranyai B., Joosten H. Biology, ecology, use, conservation and cultivation of round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.): a review // Mires Peat. 2016. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.19189/MaP.2015.OMB.212>
14. Khandy M.T., Chernoded G.K., Grigorovich V.P., Vereshchagina Yu.V., Morshneva A.V., Gorpenchenko T.Yu.

- Histological structure and composition of secondary metabolites in cell culture of *Drosera rotundifolia* L. // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69. P. 451.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722050090>
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
16. Crouch I.J., Staden J. *In vitro* propagation of *Drosera natalensis* // J. S.-Afr. Tydskr. Plantk. 1988. V. 54. P. 94.
[https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)31368-0](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)31368-0)
17. Šamaj J., Blehová A., Repčák M., Ovečka M., Bobák M. *Drosera* species (Sundew): *in vitro* culture and the production of plumbagin and other secondary metabolites // Biotechnol. Agric. For. 1999. V. 43. P. 105.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-08614-8_7
18. Iantcheva A., Vlahova M., Atanassov A. Investigation of the potential of two wild medicago species – *Medicago orbicularis* and *Medicago arabica* for *in vitro* callusogenesis and direct organogenesis // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2005. V. 19. P. 27.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817223>
19. Tomilova S.V., Globa E.B., Demidova E.V., Nosov A.M. Secondary metabolism in *Taxus* spp. plant cell culture *in vitro* // Russ. J. Plant. Physiol. 2023. V. 70. P. 227.
<https://doi.org/10.1134/S102144372270008X>
20. Budzianowski J. Naphthoquinones of *Drosera spathulata* from *in vitro* cultures // Phytochem. 1995. V. 40. P. 1145.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00313-V](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00313-V)
21. Kawiak A., Krolicka A., Lojkowska E. Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips, plant cell // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003. V. 75. P. 175.
<https://doi.org/10.1023/A:1025023800304>
22. Miclea I., Zăhan M. Propagation of *Drosera rotundifolia* and *Drosera capensis* in an *in vitro* culture system // Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca, Anim. Sci. Biotechnol. 2017. V. 74. P. 144.
<https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:0018>
23. Batista D.S., Felipe S.H.S., Silva T.D., Castro K.M., Rodrigues T.C.M., Miranda N.A., Ríos-Ríos A.M., Faria D.V., Fortini E.A., Chagas K., Silva G.T., Xavier A., Arencibia A.D., Otoni W.C. Light quality in plant tissue culture: does it matter? // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2018. V. 54. P. 195.
<https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>
24. Boonsongcheep P., Sae-foo W., Banpakoat K., Channarong S., Chitsaithan S., Uafua P., Putha W., Kerd Siri K., Putalun W. Artificial color light sources and precursor feeding enhance plumbagin production of the carnivorous plants *Drosera burmannii* and *Drosera indica* // J. Photochem. Photobiol. B. 2019. V. 199. P. 111628.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111628>
25. Makowski W., Tokarz B., Banasiuk R., Królicka A., Dziurka M., Wojciechowska R., Tokarz K.M. Is a blue – red light a good elicitor of phenolic compounds in the family *Droseraceae*? A comparative study // J. Photochem. Photobiol. B. 2019. V. 201. P. 111679.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111679>
26. Melzig M.F., Pertz H.H., Krenn L. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae herba* // Phytomedicine. 2001. V. 8. P. 225.
<https://doi.org/10.1078/0944-7113-00031>
27. Paper D.H., Karall E., Kremser M., Krenn L. Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay // Phytother. Res. 2005. V. 19. P. 323.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1666>
28. Tienaho J., Reshamwala D., Karonen M., Silvan N., Korpela L., Marjomäki V., Sarjala T. Field-grown and *in vitro* propagated round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show differences in metabolic profiles and biological activities // Molecules. 2021. V. 26. P. 3581.
<https://doi.org/10.3390/molecules26123581>
29. Vatter D.A., Shetty K. Biological functionality of ellagic acid: a review // J. Food Biochem. 2005. V. 29. P. 234.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x>
30. Caniato R., Filippini R., Cappelletti E. M. Naphthoquinone contents of cultivated *Drosera* species *Drosera binata*, *D. binata* var. *dichotoma*, and *D. capensis* // Int. J. Crude Drug Res. 1989. V. 27. P. 129.
<https://doi.org/10.3109/13880208909053952>
31. Jin J.Q., Qu F.R., Huang H., Liu Q.S., Wei M.Y., Zhou Y., Huang K.L., Cui Z., Chen J.D., Dai W.D., Zhu L., Yao M.Z., Zhang Z.M., Chen L. Characterization of two O-methyltransferases involved in the biosynthesis of O-methylated catechins in tea plant // Nat. Commun. 2023. V. 14. P. 5075.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40868-9>

Scutellaria baicalensis GEORGI: ПРОЕКЦИЯ МЕТАБОЛОМА КОРНЯ В КУЛЬТУРЕ КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ¹

© 2023 г. Ю. Н. Елькин^a, А. Ю. Маняхин^b, А. Ю. Степанова^c *

^aТихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

^bФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

^cИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

*e-mail: step_ann@mail.ru

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Исследование посвящено сравнительной характеристике флавоноидов и фенилэтаноидов корня дикого растения шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) и культуры корневых волосков. Культура корневых волосков, полученная из семян дикого растения, демонстрирует практически идентичный с корнем набор метаболитов, при этом показывая различия в обильности метилированных и гликозилированных производных обоих классов соединений. Отмечено существенное накопление сахарозы корнями интактного растения. Метилированные флавоны, ответственные за защиту растения от биотических и абиотических стресс-факторов, более обильны в культуре корневых волосков. В обоих образцах впервые идентифицирован 7-сульфат 6-ОМе вогонин. Визуализация масс-спектрометрических данных метаболома посредством селективного ионного мониторинга показала себя как удобный инструмент обнаружения изменения метаболизма, вызванного факторами внешней среды или повреждением растения.

Ключевые слова: *Scutellaria baicalensis* Georgi, культура корневых волосков, метилированные флавоны, сравнительный метаболом, фенилэтаноиды

DOI: 10.31857/S0015330323601061, **EDN:** BDXC0I

ВВЕДЕНИЕ

Метаболиты растений являются инструментом коммуникации с окружающей средой и ее стресс-факторами. Одной из важнейших их функций вторичных метаболитов является взаимодействие с почвенным микробиомом, который прямо или косвенно, оказывает влияние на метаболизм растений, а также на сохранение корневых почек. Гены, участвующие в путях биосинтеза этих специализированных метаболитов, занимают значительное место в большом массиве генома *Scutellaria baicalensis* [1, 2]. Корни *Scutellaria baicalensis* известны тем, что они обогащены определенными 4'-дезоксифлавонами. Различные мо-

дификации, в основном, метилирование и гликозилирование молекул обоих классов полифенолов доводят число метаболитов до 130 [3]. Среди всех культур *in vitro*, а именно суспензий и каллусов, культура корневых волосков устойчиво синтезирует фенилэтаноиды (ФЭ), каффеноил рутинозид гидрокситиразола и ряд его производных. Культура корневых волосков продуцирует метаболиты в сопоставимых с корнем растения весовых отношениях [4]. Среди них флавоны с высоким терапевтическим потенциалом (вогонин 4, ороксиллин А 5 и байкалеин 3), благодаря которым сохраняется интерес к корневым волоскам, как к промышленному биотехнологическому продукту этих трех флавонов.

Культура корневых волосков, полученная из семян дикого растения Забайкальского края России [5], продуцирует идентичную палитру из восьми метилированных флавонов (МФ), в которых кроме моно-метилированных флавонов 4 и 5, в сопоставимой доле синтезируются тетра- и пента-метилированные 8 и 9 [6]. Стоит отметить, что

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323601061 для авторизованных пользователей.

Сокращения: В₅ — среда по Гамборгу, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ЖХ-МС анализ — жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией, МФ — метилированные флавоны, ФЭ — фенилэтаноиды.

в составе метаболома корня растения, культивированного в Китае, из 132 веществ половина метилированы [3].

Масс-спектрометрический анализ сечения корня с применением лазерной абляции и ЖХ-МС экстрактов обнаружил локализацию МФ в коре [7, 8]. Этот факт стал толчком к изучению роли трех целевых флавонов 3, 4, 5 в физиологии самого растения [8]. Сходство состава МФ в корнях и волосках определяется единой природой происхождения в результате инфицирования проростков семян растения почвенным биомом и бактериальной культурой, соответственно [9]. Биосинтез и регуляция метаболитов корня частично расшифрованы [1, 10–13], однако, многие пробелы в знаниях еще предстоит заполнить. Образование специфических метаболитов в ответ на биоинвазию возникает вследствие вмешательства в важные клеточные механизмы и структуры растения. Безусловно, не может быть универсального набора веществ, учитывающего все типы вредителей и патогенов, эволюционируя, растение вырабатывает несколько типов метаболитов для борьбы с ними. Эти же вещества могут синтезироваться и культурой волосков, роль которых для противодействия биоинвазии еще предстоит установить [14]. Настоящее сообщение предлагает сравнительный анализ метаболитов дикого корня и его культуры корневых волосков в надежде, что новые знания приведут к большему пониманию механизмов защиты растения и его физиологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия роста. В качестве объекта исследования использовали корневые волоски *S. baicalensis* из коллекции ИФР РАН [5]. Корневые волоски культивировали в жидкой питательной среде В₃ по Гамборгу [15] без гормонов по схеме, описанной ранее [16]. Такая схема подразумевает выращивание культуры в течение двух недель в колбах, объемом 100 мл с добавлением жидкой питательной среды – 40 мл, затем перенос их в колбы, объемом 300 мл с содержанием среды – 80 мл. Перекись водорода добавляли на 7 день культивирования, так как в течение этого времени происходила адаптация корней после перенесения на новую питательную среду. Корни дикорастущего растения *S. baicalensis* заготовлены в окрестностях пгт. Орловский Забайкальского края. Корни были высушены в тени.

Экстракция и подготовка проб к ЖХ-анализу. Отбор проб и экстракцию флавоноидов этанолом проводили по методу, описанному ранее [8]. Около 100 мг культуры корневых волосков и корней экстрагировали дважды этанолом 2 ч при 50°C. Объединенный экстракт центрифугировали 3 мин при 15 тыс. об/мин., супернатант отбирали для дальнейшего анализа методом ЖХ-МС (жидкост-

ная хроматография с tandemной масс-спектрометрией). Фильтрацию проб проводили через шприцевые PTFE фильтр-насадки (“Phenomenex”, США) размер пор 0.45 мкм, диаметр – 13 мм.

ЖХ-МС анализ был проведен в центре коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” Федерального научного центра наземного биоразнообразия Восточной Азии ДВО РАН. Идентификацию и количественное определение всех компонентов проводили с использованием аналитической ВЭЖХ-МС/МС системы Infinity 1260 (Agilent Technologies, “Santa Clara”, CA, США), оснащенной фотодиодным матричным детектором G1315D, насосом G1311C, термостатом колонки G1316A и автосамплером G1329B. Хроматографическая система была сопряжена с масс-спектрометром с ионной ловушкой (Bruker HCT ultra PTM Discovery System, “Bruker Daltonik GmbH”, Бремен, Германия), оснащенным электроспреем ионизирующим источником (ESI). МС-анализы проводились в режиме регистрации отрицательных ионов. Использовались следующие параметры прибора: диапазон детектирования m/z составлял 100–760, расход осушающего газа (N₂) 10.0 л/мин, давление распыляемого газа (N₂) 241 кПа, потенциал источника ионов составлял 4.0 кВ, температура осушающего газа 365°C. Tandемные масс-спектры были получены в режиме Auto-MS2 (интеллектуальная фрагментация) с использованием увеличения энергии столкновения. Амплитуда фрагментации была установлена равной 1 В. Данные собирались с помощью программного обеспечения Bruker Daltonics Compass 1.3 esquire control (версия 6.2.581.3) и обрабатывались с помощью программного обеспечения для анализа данных Bruker Daltonics Compass 1.3 (версия 4.0.234.0).

Для разделения использовали аналитическую колонку (Zorbax C18, 150 мм, i.d 2.1 мм, 3.5 мкм part size, “Agilent Technologies”, США). Разделение проводили при следующих условиях: температура колонки составляла 40°C, подвижная фаза состояла из 0.1% водного раствора муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила (В). Использовали следующий градиент элюирования со скоростью потока 0.2 мл/мин: 0 мин 20% В; 3 мин 20% В; 25 мин 80% В, 30 мин 100% В, а затем элюент В до 40 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Представление ЖХ-МС данных

Методы tandemной масс-спектрометрии для изучения метаболома растений являются наиболее подходящими среди других методов, применяемых для анализа экстрактов, содержащих большое количество компонентов [17]. Такой подход не предусматривает обязательного опре-

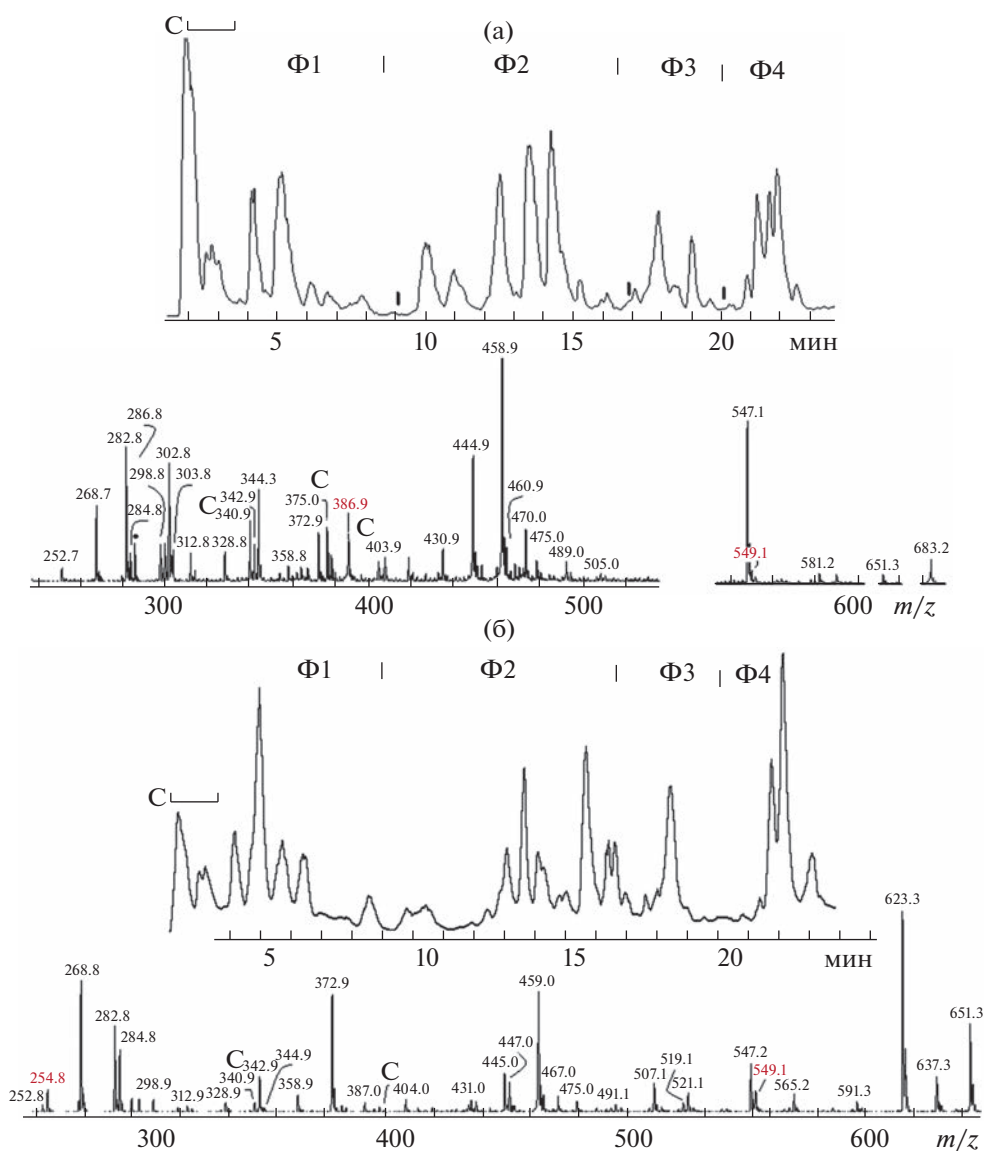


Рис. 1. Профиль хроматограммы полного ионного тока и полного масс-спектра экстрактов *S. baicalensis*. (а) — корень, (б) — культура корневых волосков. Ф1–Ф4 — условные фракции, отнесенные к углеводам, гликозидам фенолэтаноидов и флавоноидов, свободным флавоном и метилированным флавоном соответственно. С — сахара.

деления строения молекул веществ, извлеченных из растения. Получаемый методом ЖХ-МС набор данных (время удерживания, спектрофотометрические данные, масс-спектр ионов и продуктов их фрагментации) позволяют идентифицировать и определить вещества и их принадлежность в составе метаболома.

Тщательно установленный биохимический состав корней, культивируемого в Китае растения *Scutellaria baicalensis* [3], дал возможность определить и сравнить по ЖХ-МС данным состав веществ, принадлежащих к классам углеводов, фенолэтаноидов (ФЭ), флавоноидов, корневых волосков и корней дикого растения. В источнике ионов масс-спектрометра вещества этих классов трансформируются в алколят-, фенолят-, а

глюкурониды флавонов еще и в карбоксилат-анионы $[M-H]^-$. Таким образом, применение ЖХ-МС с электроспреей ионизацией в режиме регистрации отрицательных ионов позволяет оценить так же относительные содержания веществ, исключая углеводы, позволяя сопоставить соотношение флавонов и их гликозидов в волосках и корнях для понимания физиологии растения.

Вследствие различной полярности, метаболиты хроматографически разделяются на 4 условные фракции, представленные в виде полного ионного тока (ПИТ): углеводы (Ф1), гликозиды фенолэтаноидов и флавонов (Ф2), флавоны (Ф3) и метилированные флавоны (Ф4), представленные в виде полного ионного тока (ПИТ) (рис. 1). Класс и тип соединений был определен исходя из

интегральных масс-спектров (иМС) фракций, продуктов фрагментации анализируемых ионов и времени удерживания. Детальные данные представлены в оригинальной форме [8].

Полный масс-спектр (ПМС) элюированных метаболитов показывает относительное содержание флавоноидов и фенилэтаноидов. Сахароза, представляющая основное вещество первой фракции, отражается в ПИТ пиками алкоголят-аниона m/z 341, аддукт-ионами с хлором m/z 377/379, с муравьиной m/z 387 (корневые волоски) или уксусной кислотой 401 (корни) (рис. 1). Обилие сахарозы (ф1) и метилированных флавонов (ф4) сравнивать не совсем корректно из-за различия сечений ионизации этих классов веществ.

Профиль метилированных флавонов

Палитра метилированных флавонов — финальных компонентов пути биосинтеза в корневых волосках и корне *Scutellaria baicalensis*, идентична по качественному составу, но отличается количественным соотношением веществ [6] (рис. 2а, 2б). Заметное многообразие МФ корней связано с формированием коры. Примечательна обильность моно- и тетра-метилированных флавонов 4 и 8 в корне и культуре корневых волосков партии 1. Профили их ионных хроматограмм (ИХ) показывают высокую чувствительность культуры корневых волосков к изменениям условий среды. Так, отмечено, что соотношение МФ при пересевах культуры волосков меняется. Если насыщенность МФ корневых волосков партии 1 напоминает палитру корня, то МФ партии 2 сохраняются заметными только три-ОМе флавонов 6 и 7 (m/z 343), в то время как превалируют флавоны 4 и 8 (рис. 2б, слева).

Окислительный стресс, вызванный добавлением в среду 20 мкл 3% перекиси водорода, демонстрирует заведомую устойчивость 8-О-метилтрансферазы и ее продукта — вогонина 4, партии 3 (рис. 2б, справа). Интересным представляется факт непереносимости культуры волосков в МФ флавонов 4 и 8. Насыщенная палитра МФ корня и обилие в нем финального пента-ОМе флавонов 9 характеризует защитную функцию коры корня [8] (рис. 2б).

Свободные или гидроксильные флавоны

Биосинтез корнеспецифических флавонов, начинающийся дегидрированием пиноцембрина 0 с превращением его в хризин 1, из которого в дальнейшем с помощью 6- и 8-гидроксилаз образуется байкалеин 3 и нор-вогонин 2, соответственно [1]. Однако все больше появляется данных, что данный путь не является исключительным. В корнях растений присутствуют и другие три-ОН-флавоны [3]. Так в корне интактного дикого

растения нами было обнаружено вещество н, отнесенное к флавону № 97, ранее найденного в корнях шлемника, выращенного на плантации в Китае [3]. Состав и обилие гидрокси-флавонов корней и культуры корневых волосков от монодо тетра- существенно отличаются (рис. 3). В корнях обнаружен известный набор свободных флавонов (1, 2, 3, к, н). Скутеляреин к, доля которого существенна в корне, ничтожна в корневых волосках 1, в которых обильны неизвестный тетра-ОН флавоны л. Примечательно, что корневые волоски содержат предшественник синтеза флавонов, пиноцембрина 0 и флавоны л, которые не найдены в корнях в сопоставимом количестве с байкалеином 3. Кроме того, культура корневых волосков не продуцирует скутеляреин к.

Гликозиды метилированных флавонов

Монометилированные флавоны 4 и 5 обильно гликозилируются глюкуронозилтрансферазой и накапливаются в сердцевине корня как гликозиды 4г и 5г [8] (рис. 4а). На порядок менее обильны в корне гликозид 6-ОМе вогонина 10 г. Еще менее обильны гликозиды (m/z 475) многочисленных монометилированных флавонов (m/z 299) продуктов последующего гликозилирования. Интересен результат гликозилирования в волосках партии 1: доминирующий гликозид вогонина 4г сопровождается заметными гликозидами три- и тетра-метилированных флавонов 6г, 7г и 8г (ионы m/z 519 и m/z 549, соответственно) (рис. 4б). Их относительная доля в волосках партии 2 заметно больше (рис. 4в). Интересно, что их доля еще более возрастает в волосках партии 3 под действием окислительного стресса (рис. 4г).

Гликозиды свободных флавонов

Синтез флавонов в корне сопровождается их гликозилированием с наиболее обильной продукцией гликозидов байкалеина 3г и нор-вогонина 2г (рис. 4а). Тогда как и следов гликозида скутеляреина кг не обнаружено. В волосках партии 1 снижается синтез байкалина 3г и особенно нор-вогонина 2г относительно предшественников 0 и 1. Вместе с гликозидом нг заметную долю в волосках составляет С-гликозид вогонина 4г. Паразитический синтез демонстрируют волоски партии 2 с обильным продуцированием гликозидов флавонона 0 и флавонов 1, 2, н, к (рис. 4в). Добавление же H_2O_2 к этим волоскам на стадии воспроизводства стимулировало только синтез гликозида кг (рис. 4г).

Сульфаты флавонов

Замещение гидроксильных групп флавонов на метильные и ацильные широко распространено

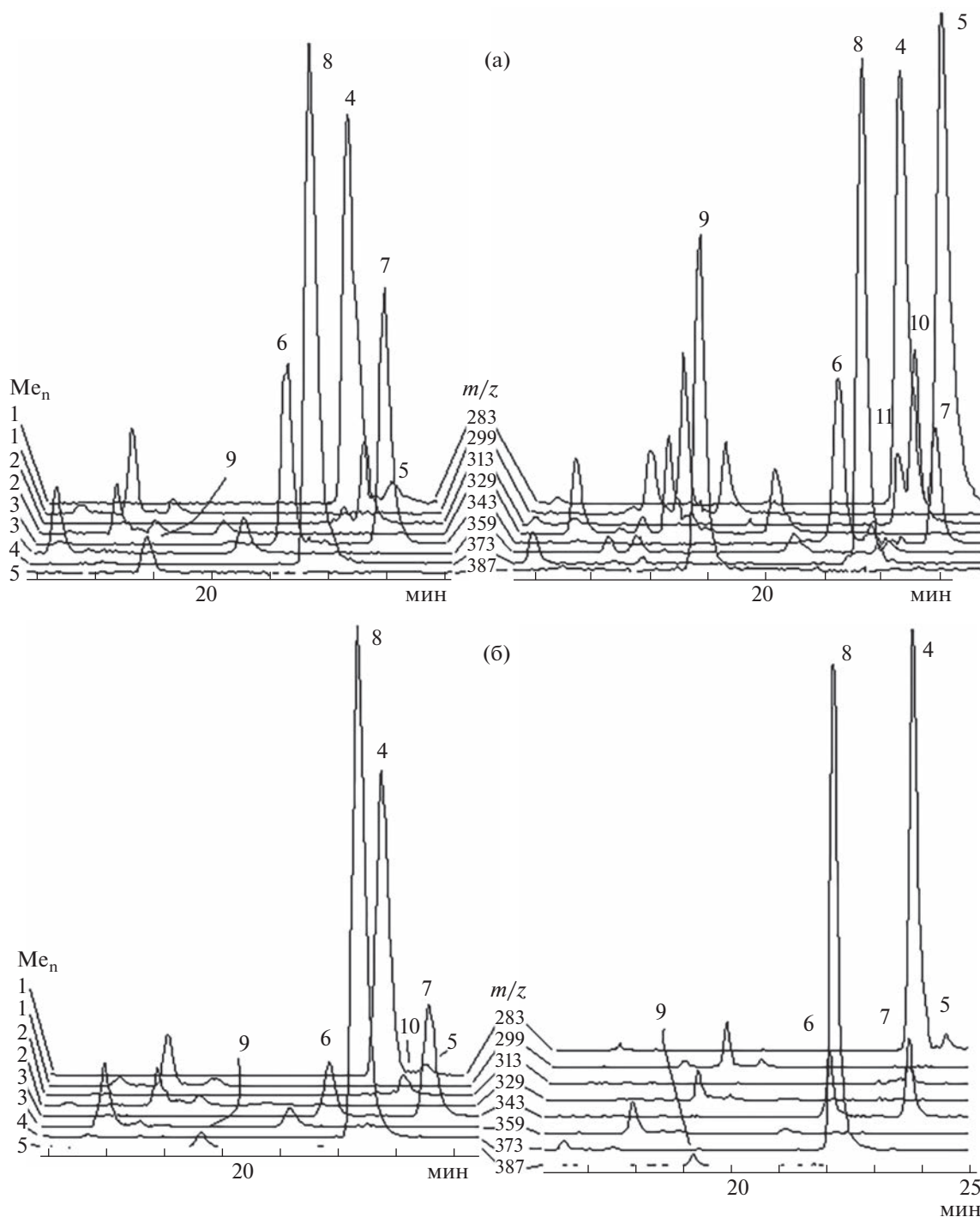


Рис. 2. 3D-ионные хроматограммы 8 наиболее обильных метилированных флавонов *S. baicalensis*: (а) — корень, (б) — культура корневых волосков. 4 — (2,7-ди-ОН-8-ОМе-флаво) вогонин, 5 — 2,7-ди-ОН-6-ОМе-флаво (ороксилин А), 6 — 5-ОН-7,8,6'-три-ОМе флаво, 7 — 5,2'-ди-ОН-6,7,8-три-ОМе флаво, 8 — 5,2'-ди-ОН-6,7,8,6'-тетра-ОМе флаво, 10 — 2,7-ди-ОН-6,8-ди-ОМе флаво (6-ОМе вогонин), 11 — 2,6-ди-ОН-7,8-ди-ОМе флаво.

среди растений, гораздо реже встречаются случаи сульфатирования, как правило по С7 атому [18]. В литературе не описаны случаи обнаружения сульфатов флавонов в *Scutellaria baicalensis*, однако анализ продукт-ионов диссоциации иона m/z 393 при Rt 15 мин в МС корней свидетель-

ствует об отщеплении фрагмент-иона массой 80 Да (рис. 3). В МС волосков партии 1 также обнаружен ион m/z 393. Он не был отобран в автоматически для МС2, но в режиме селективного мониторинга его продукт-ион m/z 313 был обнаружен. Обильность сульфатированного ди-ме-

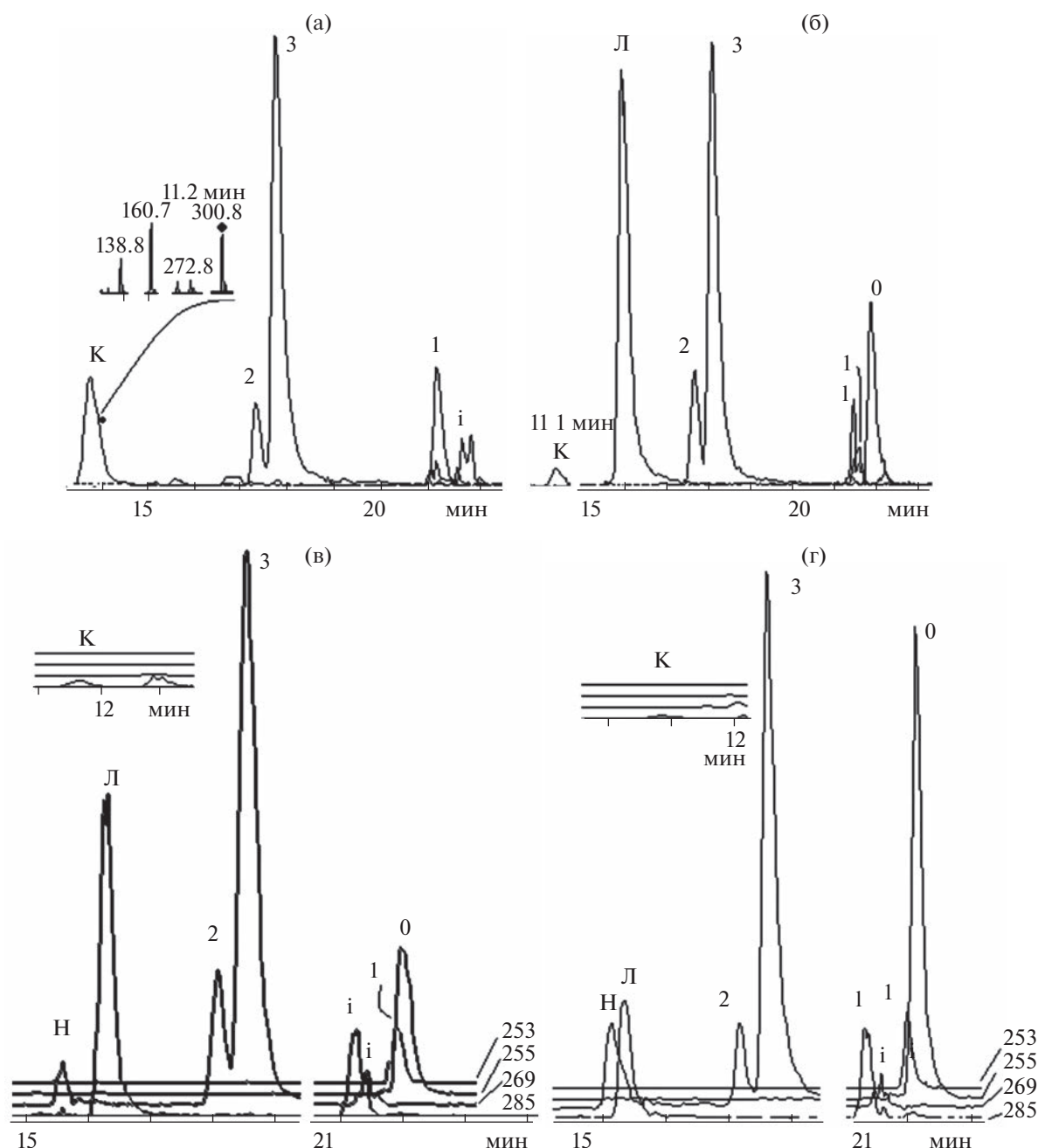


Рис. 3. Ионные хроматограммы свободных флавонов *S. baicalensis*: (а) – корня. Вставка: мс2 спектр предположительно не флавоноидной молекулы, (б) – 2D, (в, г) – 3D культуры корневых волосков партии 1, 2, 3, соответственно. 0 – пинцебрин, 1 – хризин, 2 – нор-вогонин, 3 – байкалеин, н – три-ОН-флаван, л – тетра-ОН-флаван, к – 5,6,7,4'-тетра-ОН-флаван (скутелареин), I – ^{13}C -изотопные ионы обильных флавонов 4 и 5.

токсифлавона 10s даже больше, чем для самого его предшественника 10. Точное измерение иона m/z 393 дает значение для ^{32}S 393.0258 (расчет 393.0286).

Кофеноил рутинозиды гидрокситиразола

Фенилэтаноиды широко распространены в растениях, особенно используемых в качестве ле-

карственных [19]. В волосках и корнях *Scutellaria baicalensis* ФЭ в разной степени метилированы одной и двумя группами. В результате эти производные обуславливают три серии ионов m/z 623, 637 и 651, соответственно (рис. 5). В корнях, точнее в камбии, доминируют метилированные (рис. 5а, 5г). В культуре корневых волосков сопоставимая часть ФЭ m/z 623 остается не метилиро-

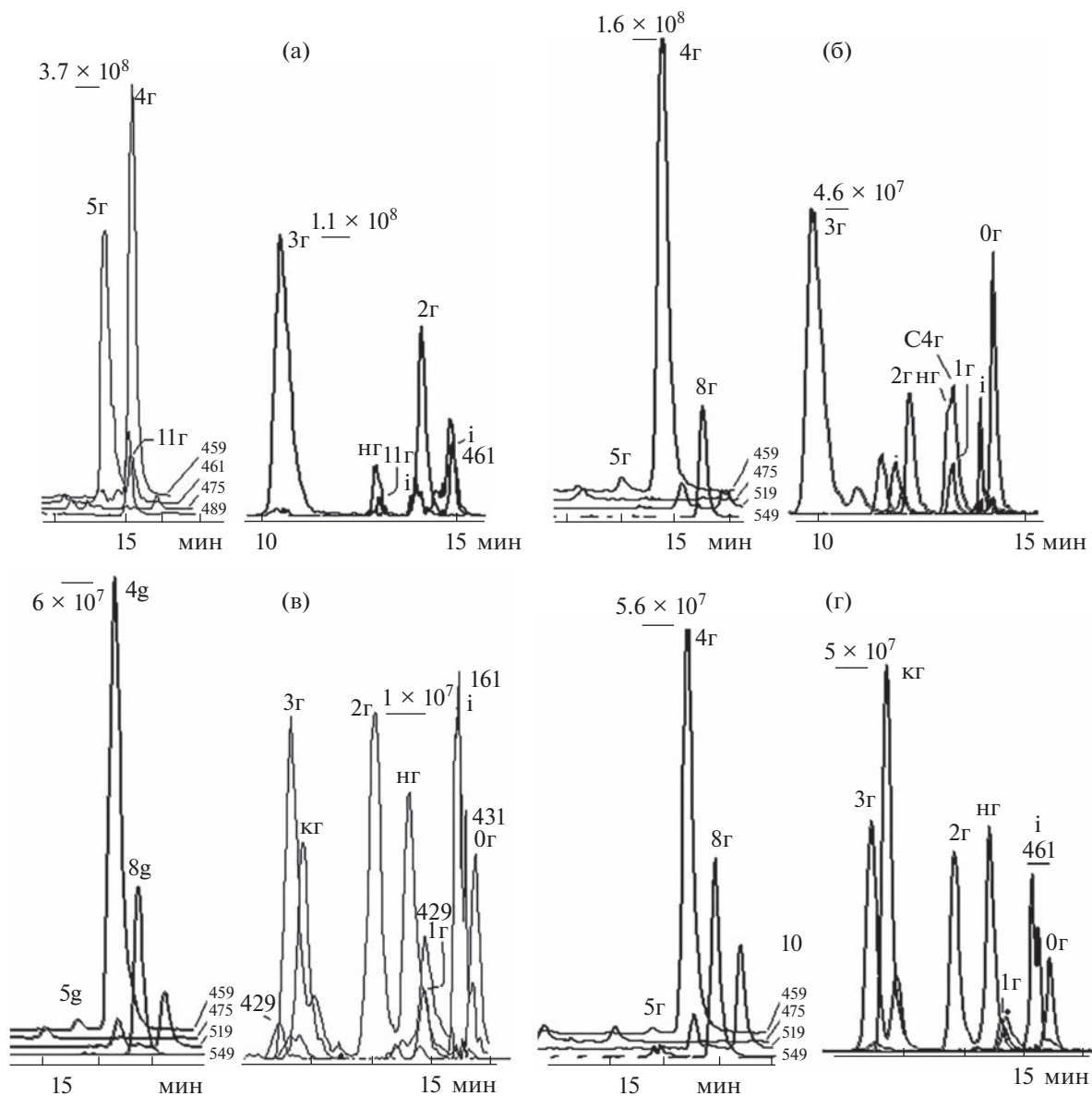


Рис. 4. 3D-ионные хроматограммы гликозидов (индекс г) метилированных и 2D на вставках свободных флавонов *S. baicalensis*: (а) – корня, (б, в, г) – культуры корневых волосков партий 1, 2, 3, соответственно. 0 – пиноцембрин, 1 – хризин, 2 – нор-вогонин, 3 – байкалеин, н – три-ОН-флавоны, л – тетра-ОН-флавоны, к – 5,6,7,4'-тетра-ОН-флавоны (скутеллареин), i – ^{13}C -изотопные ионы обильных флавонов.

ванной (рис. 5б). При окислительном стрессе волоски расходуют значительную часть ФЭ не защищенных метильной группой (рис. 5в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Приоритет синтеза и назначение метилированных флавонов в корнях растения ранее продемонстрированы на примере идентичности наиболее обильных компонентов [6]. Однако еще один обильно метилированный 5,7-ди-ОН-ди-6,8-ОМфлавоны (m/z 345) не упоминался в роли компонента, участвующего в обеспечении безопасности корня растения (рис 1а). Его содержание в

культуре корневых волосков крайне незначительно, поскольку он не является предшественником синтеза пентаметилированного флавоны 9. В корнях *Scutellaria baicalensis*, выращенного в Китае, он также не был обнаружен. Действительно, в промышленной практике выращивания растения на юге Приморского края, корни культурных растений не имели ярко выраженной одревесневшей коры. Этот МФ является продуктом третьего эшелона гидроксирования, который корневые волоски не синтезируют. Обильные флавоны 6 и 7, m/z 343, также могут быть предшественниками этого пента-метилированного флавоны 9. Корневые волоски ограничиваются тетра-метилиро-

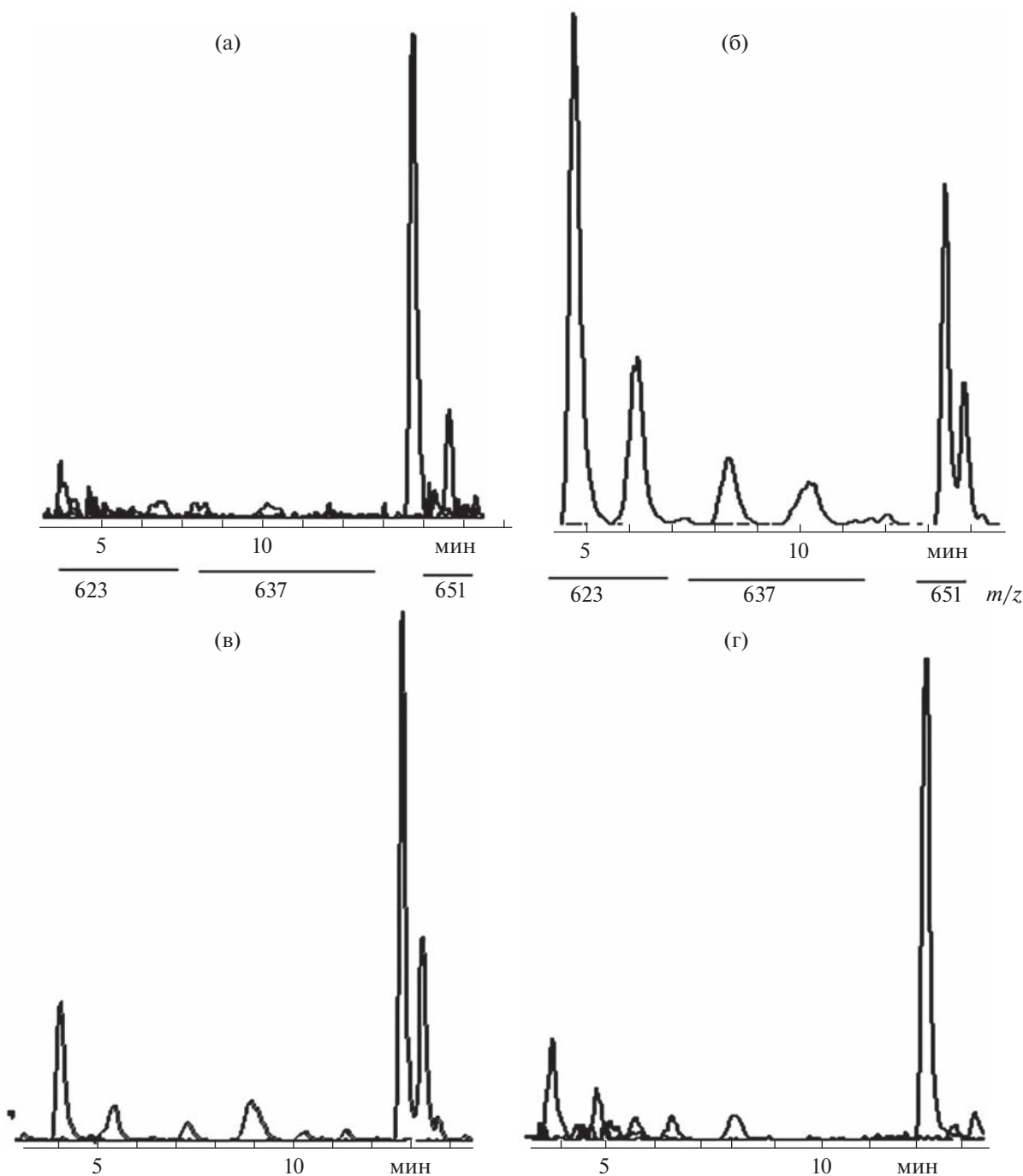


Рис. 5. 2D-ионные хроматограммы фенолэтаноидов (ионы m/z 623, 637, 651) *S. baicalensis*: (а) — корня, (б, в) — культуры корневых волосков партий 1 и 2; (г) — камбий корня.

ванным флавоном 8 (рис. 1б), при этом, в отличие от корней, они продуцируют гликозиды 6г, 7г и 8г (рис. 4а, 4в, 4г). Корни создают принципиальный запас гликозидов вогонина 4г и ороксилена 5г в сердцевине [8]. Следуя необходимости сохранения целостности тела корня, создается так же огромный запас байкалина 3г. Культура корневых волосков более обильно продуцирует фенолэтаноид, ион m/z 623, носителя двух катехол групп, для не-

отложной защиты от биоинвазии. Однако остается непонятным почему в культуре корневых волосков и в корнях они заметно метилированы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в предложенном формате ЖХ-МС данные о содержании веществ в культуре волосков и корнях растения показали практически

полную идентичность метаболитов. Наиболее наглядной оказалась потребность синтезировать метилированные флавоны двух типов: моно- и полиметилированные. Результат проекции метаболома культуры корневых волосков на метаболом корня показал, что одни и те же молекулы флавоноидов и фенилэтаноидов синтезируются корневыми волосками почти в полном составе, демонстрируя упорный консерватизм генома в синтезе химической защиты независимо от природы аггессора.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Статья не содержит исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы выражают глубокую признательность проф. А. М. Носову за предложение сравнить метаболомные профили культуры волосков и корня растения.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 121031000120-9, № 121050500047-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cui M.Y., Lu A.R., Li J.X., Liu J., Fang Y.M., Pei T.L., Zhong X., Wei Y.-K., Kong Y., Wen-Qing Q., Hu Y.-H., Yang J., Chen X.-Y., Martin C., Zhao Q. Two types of O-methyltransferase are involved in biosynthesis of anticancer methoxylated 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi. // Plant Biotech. J. 2022. V. 20. P. 129. <https://doi.org/10.1111/PBI.13700>
2. Fang Y., Liu J., Zheng M., Zhu S., Pei T., Cui M., Chang L., Xiao H., Yang J., Martin C., Zhao Q. SbMYB3 transcription factor promotes root-specific flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis* // Horticulture Res. 2023. V. 10. uhac266. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac266>
3. Qiao X., Li R., Song W., Miao W.-J., Liu J., Chen H.-B., Guo D.-A., Ye M. A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering // J. Chromatog. A. 2016. V. 1441. P. 83. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.079>
4. Stojakowska A., Malarz J. Flavonoid production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* // J. Plant Physiol. 2000. V. 156. P. 121. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80282-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80282-5)
5. Kuzovkina I.N., Guseva A.V., Alterman I.E., Karnachuk R.A. Flavonoid production in transformed *Scutellaria baicalensis* roots and ways of its regulation // Russ. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 448. <https://doi.org/10.1023/A:1016739010716>
6. Elkin Y.N., Kulesh N.I., Stepanova A.Y., Solovieva A.I., Kargin V.M., Manyakhin A.Y. Methylated flavones of the hairy root culture *Scutellaria baicalensis* // J. Plant Physiol. 2018. V. 231. P. 277. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.009>
7. Sun C., Zhang M., Dong H., Liu W., Guo L., Wang X. A spatially-resolved approach to visualize the distribution and biosynthesis of flavones in *Scutellaria baicalensis* Georgi // J. Pharmac. Biomed. Anal. 2020. V. 179. P. 113014. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2019.113014>
8. Elkin Y.N., Kulesh N.I., Shishmarev V.M., Kargin V.M., Manyakhin A.Y. *Scutellaria baicalensis*: the end of flavone biosynthesis pathway // Acta Biol. Cracoviensia Series Bot. 2022. V. 64. P. 39. <https://doi.org/10.24425/abcsb.2021.136704>
9. Gutierrez-Valdes N., Häkkinen S.T., Lemasson C., Guillet M., Oksman-Caldentey K.M., Ritala A., Cardon F. Hairy root cultures – a versatile tool with multiple applications. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 33. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00033/BIBTEX>
10. Zhao Q., Zhang Y., Wang G., Hill L., Weng J.K., Chen X.-Y., Xue H., Martin C. A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* // Sci. Adv. 2016. V. 2. e1501780. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501780>
11. Zhao Q., Cui M.Y., Levsh O., Yang D., Liu J., Li J., Hill L., Yang L., Hu Y., Weng Y.-K., Cheng X.-Y., Martin C. Two CYP82D enzymes function as flavone hydroxylases in the biosynthesis of root-specific 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* // Molec. Plant. 2018. V. 11. P. 135. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.009>
12. Zhao Q., Yang J., Cui M.Y., Liu J., Fang Y., Yan M., Qiu W., Shang H., Xu Z., Yidiresi R., Weng J.K., Pluskal T., Vigouroux M., Steuernagel B., Wei Y. et al. The reference genome sequence of *Scutellaria baicalensis* provides insights into the evolution of wogonin biosynthesis // Molec. Plant. 2019. V. 12. P. 935. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.04.002>
13. Zhao Q., Chen X.Y., Martin C. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants // Sci. Bull. 2016. V. 61. P. 1391. <https://doi.org/10.1007/S11434-016-1136-5>
14. Ramaroson M.L., Koutouan C., Helesbeux J.J., Le Clerc V., Hamama L., Geoffriau E., Briard M. Role of phenylpropanoids and flavonoids in plant resistance to pests and diseases // Molec. 2022. V. 27. P. 8371. <https://doi.org/10.3390/molecules27238371>
15. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. 1968. V. 50. P. 151. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
16. Solov'eva A.I., Evsyukov S.V., Sidorov R.A., Stepanova A.Y. Correlation of endogenous β -glucuronidase activity with differentiation of in vitro cultures of *Scutellaria baicalensis* // Acta Physiol. Plant. 2020. V. 42. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03159-0>
17. Hu L., Liu J., Zhang W., Wang T., Zhang N., Lee Y.H., Lu H. Functional metabolomics decipher biochemical functional and associated mechanisms underlie small-molecule metabolism // Mass Spectr. Rev. 2020. V. 39. P. 417. <https://doi.org/10.1002/MAS.21611>
18. Teles Y.C.F., Souza M.S.R., De Souza M. de F.V. Sulfated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities // Molec. 2018. V. 23. P. 480. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020480>
19. Yang Y., Xi D., Wu Y., Liu T. Complete biosynthesis of the phenylethanoid glycoside verbascoside // Plant Commun. 2023. V. 4. P. 100592. <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2023.100592>

УДК 581.1:634.63:58.036.5:547.56

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ И ОЛЕУРОПЕИНА В ФОРМИРОВАНИИ МОРОЗОСТОЙКОСТИ *Olea europaea* L.

© 2023 г. А. Е. Палий^a, *, Т. Б. Губанова^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки
“Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр Российской академии наук”, Ялта, Россия

*e-mail: gubanova-65@list.ru

Поступила в редакцию 28.09.2023 г.

После доработки 05.10.2023 г.

Принята к публикации 12.10.2023 г.

Определяли степень участия олеуропеина, рутина и цинарозида в процессах формирования зимостойкости и морозоустойчивости у 4 сортов маслины европейской *Olea europaea* L. и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. and G. Don) Cif. в природных и лабораторных условиях. Для оценки уровня стресса в листьях определяли содержание пролина, максимум которого был отмечен у слабостойкого подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*. Для выявления особенности накопления фенольных веществ в природных условиях сопоставляли изменение их содержания в листьях и среднедекадных значений эквивалентно-эффективных температур. В лабораторных условиях изучали содержание фенольных соединений при различных режимах охлаждения: 0°C, 6 ч → –8°C, 8 ч (вариант 1); 0°C, 6 ч → –2°C, 6 ч → –8°C, 8 ч (вариант 2); –8°C, 8 ч (вариант 3); –8°C, 12 ч (вариант 4). Установлено, что 6 ч выдерживание побегов при 0°C положительно влияло на зимостойкость *O. europaea*, тогда как 6 ч экспозиция при –2°C приводила к развитию стресса. В первом варианте опыта у устойчивого сорта Никитская содержание олеуропеина возрастало. У сортов со средней степенью устойчивости (Раццо и Асколано) наблюдалась активация биосинтеза флавоноидов и олеуропеина. У слабостойкого сорта Кореджиоло фенольные вещества активно расходовались, а следовые количества олеуропеина и отсутствие изменений в содержании рутина и цинарозида у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*, вероятно, были связаны с его менее тесными родственными связями с *O. europaea*. Выявлено, что у генотипов с низкой морозоустойчивостью активация синтеза фенольных соединений происходила лишь при действии стрессового фактора (–2°C), что не позволило им своевременно адаптироваться, тогда как у относительно устойчивых сортов эти процессы начинались на более ранних этапах холодовой адаптации. Для сортов Кореджиоло, Раццо и Асколано длительное воздействие отрицательных температур явилось критическим фактором, тогда как для *O. europaea* subsp. *cuspidata* – летальным (вариант 4). Различия в синтезе фенольных соединений, выявленные в этих условиях, были связаны не только со степенью морозоустойчивости, но и с сортоспецифичностью генотипов *O. europaea*. Полученные данные позволили предположить, что олеуропеин, рутин и цинарозид являются элементами механизмов защиты растений маслин от негативного влияния отрицательных температур. Видимо, изученные соединения играют роль криопротекторов и антиоксидантов, участвуют в формировании зимостойкости. Большое значение имели условия активации биосинтеза фенольных соединений. У высокоустойчивого сорта Никитская их накопление происходило под влиянием температур близких к 0°C, а у неустойчивых сорта Кореджиоло и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* – непосредственно во время действия начальных повреждающих температур.

Ключевые слова: *Olea europaea*, морозоустойчивость, пролин, олеуропеин, рутин, цинарозид

DOI: 10.31857/S0015330323600857, **EDN:** BFTZSQ

ВВЕДЕНИЕ

Проблема исследования реакции растений на действие отрицательных температур различной интенсивности, а также процесса низкотемпературного закалывания особо актуальна в связи с

наблюдаемыми климатическими изменениями [1]. В южных регионах, таких как Южный берег Крыма (ЮБК), проблема зимостойкости древесных растений имеет свою специфику, поскольку здесь широко распространены лиственные вечнозеленые растения, среди которых много видов, не имеющих физиологического покоя. Для их роста и развития большую опасность представляют оттепели, участвовавшие в зимний период и влия-

Сокращения: ПФО – полифенолоксидаза, ЭЭТ – эквивалентно-эффективные температуры, ЮБК – Южный берег Крыма.

ющие на зимостойкость. Способность растительного организма переносить условия зимы и ранней весны без значительных повреждений зависит не только от генотипа, но и физиолого-биохимических процессов в клетках, тканях и органах в период закаливания [2, 3]. Успешность метаболических изменений зависит как от физиологического состояния самого растения, так и от интенсивности и длительности стрессового воздействия, и в этом большая роль принадлежит низкомолекулярным биологически активным веществам. Известно, что интенсификация процессов ПОЛ относится к неспецифическим проявлениям стресса, в том числе и низкотемпературного [4, 5]. Поэтому исследования роли биологически активных веществ в формировании и реализации морозоустойчивости и зимостойкости растений приобретает не только практическое, но и теоретическое значение.

В связи с высокой хозяйственной ценностью маслины (*Olea europaea* L.) широко культивируются в странах с субтропическим климатом, где в последнее время используются не только их плоды, но и листья, как источник биологически активных веществ с широким спектром фармакологического действия. Одна из проблем расширения культурного ареала маслин заключается в недостаточной изученности ее морозоустойчивости. Анализ научной литературы показал, что в большом количестве работ представлены результаты исследований фенольных соединений маслины в связи с их терапевтической ценностью, а сведения, касающиеся роли этих веществ в самом растении и их участии в процессах адаптации, немногочисленны [6–8].

Олеуропеин — вещество фенольной природы, которое встречается только у представителей сем. Oleaceae и является основным биологически активным соединением листьев, плодов, корней и побегов *O. europaea* [9]. В высоких концентрациях он содержится в созревающих плодах маслины, придавая им горький вкус. Олеуропеин представляет собой гликозилированный секоиридоид — производное эленоловой кислоты, связанной сложноэфирной связью с гидрокситирозолом и гликозидной связью с глюкозой [10]. Биосинтез олеуропеина в растении происходит по сложному пути синтеза как фенолов, так и терпеновых соединений. Идентифицировано более 200 генов, кодирующих синтез олеуропеина, однако процесс его образования из гидрокситирозола и секоэлагина до сих пор неясен [11–13]. Установлено, что при холодовом стрессе у растений маслины повышалась активность двух ферментов: фенилаланин-аммиаклиазы и полифенолоксидазы (ПФО) [14]. Было высказано предположение, что повышение активности ПФО способствует антиоксидантной защите тканей растений. Недавние исследования связали повышенную активность ПФО со стресс-

реакцией, вызванной абиотическим стрессом, например, переохлаждением [15, 16]. Ген ПФО участвует в выработке высокоактивного антиоксиданта гидрокситирозола, его экспрессия повышается при развитии стрессового состояния [17]. Показано, что биосинтез олеуропеина активизируется у холодоустойчивых растений *O. europaea* и снижает их чувствительность к низким положительным температурам [18]. Данный факт позволяет предположить, что олеуропеин играет определенную роль в устойчивости.

Известно, что в листьях маслины, помимо олеуропеина, также содержатся флавоноиды: гликозиды кверцетина, лютеолина, апигенина и др. Имеются данные об увеличении содержания рутина (кверцетин-3-О-рутинозида) и цинарозида (лютеолин-7-О-глюкозида) в растительных тканях в ответ на действие стресс-факторов различной природы [19, 20]. Так, в исследованиях немецких ученых показано, что умеренный холод увеличивает накопление гликозидов лютеолина, в том числе и цинарозида, в перце чили и болгарском перце [21]. Водный стресс стимулировал синтез лютеолина, кверцетина и рутина у хризантемы сорта Taraneh, а также лютеолина и апигенина — у сорта Azita [22]. Однако данные о роли флавоноидов в формировании устойчивости растений к отрицательным температурам в научной литературе отражены не в полной мере.

Ранее нами были проведены многолетние исследования по изучению роли суммарного содержания фенольных соединений в формировании устойчивости генотипов *O. europaea* к отрицательным температурам. Было установлено, что накопление суммы фенольных соединений зависело от конкретных погодных условий и влагообеспеченности [23]. Холодные периоды 2017–2018 гг. и 2018–2019 гг. отличались более высокими температурными показателями и количеством осадков, что явилось причиной пролонгирования ростовых процессов, позднего наступления вынужденного покоя. В частности, завершение верхушечного роста у побегов *O. europaea* осенью 2018 г. было отмечено во второй декаде ноября. В этих погодных условиях наблюдалось более интенсивное накопление фенольных веществ у всех изучаемых представителей *O. europaea*, по сравнению с относительно холодной зимой 2016–2017 гг. [23]. Выявленная связь погодных условий с изменением содержания суммы фенольных веществ позволила сделать вывод об их участии в адаптивных процессах, однако однозначной зависимости между их содержанием и степенью морозоустойчивости установить не удалось. В связи с этим следующий этап наших исследований был посвящен изучению роли индивидуальных фенольных соединений в реализации защитных механизмов у генотипов *O. europaea*, как в полевых условиях,

так и в контролируемых (при различных режимах температурного воздействия).

Цель работы — определить степень участия некоторых фенольных соединений в процессах формирования зимостойкости и морозоустойчивости у 4 сортов *Olea europaea* и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* в природных и лабораторных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований были выбраны растения маслины европейской (*Olea europaea* L.) местного сорта Никитская (выделен Никитским ботаническим садом), интродуцированные сорта Раццо, Кореджиоло, Асколяно, а также подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. and G. Don) Cif. Степень их морозоустойчивости, значения критических и начальных повреждающих температур была установлена ранее [24]: высокоустойчивый сорт Никитская (начальные повреждающие температуры $-8...-10^{\circ}\text{C}$, критические $-16...-18^{\circ}\text{C}$); среднеустойчивые сорта Раццо и Асколяно (начальные повреждающие температуры $-6...-8^{\circ}\text{C}$, критические $-12...-14^{\circ}\text{C}$); слабоустойчивый сорт Кореджиоло (начальные повреждающие температуры $-6...-8^{\circ}\text{C}$, критические $-12...-14^{\circ}\text{C}$). Самая низкая морозоустойчивость выявлена у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* (начальные повреждающие температуры $-4...-6^{\circ}\text{C}$, критические $-10...-12^{\circ}\text{C}$) [23].

Опыты по искусственному промораживанию однолетних побегов проводили в климатической камере Votsch VT 4004 (Vötsch Industrietechnik GmbH, Германия) в течение холодного периода на ЮБК. Градиент изменения температуры в камере составил 2°C в ч [25]. В соответствии с климатическими особенностями региона ЮБК, где выраженный устойчивый переход среднесуточных температур воздуха через 0°C отсутствует, среднесезонного (за период 1991–2020 гг.) дата устойчивого перехода температуры воздуха через 10°C в сторону понижения приходится на 9 ноября, а вероятность морозов обычно наблюдается во второй половине января–февраля, были выбраны схемы проведения экспериментов. Опыты по изучению режимов охлаждения на адаптацию к низким температурам генотипов *O. europaea* проводили с учетом сложившихся погодных условий (рис. 1) — вторая декада ноября, режимы охлаждения: -0°C , 6 ч $\rightarrow -8^{\circ}\text{C}$, 8 ч (вариант 1); вторая декада декабря, режимы охлаждения: -0°C , 6 ч $\rightarrow -2^{\circ}\text{C}$, 6 ч $\rightarrow -8^{\circ}\text{C}$, 8 ч (вариант 2). Для оценки влияния продолжительности действия отрицательных температур на генотипы *O. europaea* был выбран период максимальных вероятностей наступления морозов $\geq -7^{\circ}\text{C}$, опасных для субтропических культур — вторая декада января и первая декада февраля. В опытах использовали два режима низ-

котемпературного воздействия: -8°C в течение 8 ч (вариант 3) и -8°C в течение 12 ч (вариант 4).

Для оценки влияния погодных условий на синтез фенольных соединений и пролина в листьях генотипов *O. europaea* принимали во внимание средние за 10 суток до даты отбора проб значения эквивалентно-эффективных температур (ЭЭТ), что позволило учесть не только влияние температурного фактора, но и сопутствующих — влажности воздуха и скорости ветра. Необходимость анализа ЭЭТ связана с особенностями зимнего сезона на ЮБК, где штормовые ветры со скоростью 25 м/с и более, характерны для этого периода, и случаются каждые 8–9 лет из 10 [26]. Расчет ЭЭТ осуществляли по формуле А. Миссенарда [27, с. 83].

$$\text{ЭЭТ} = \frac{37 - (37 - T_a)}{\left(0.68 - 0.0014RH + \frac{1}{1.76 + 1.4v^{0.75}}\right)} - 0.29T_a \left(1 - \frac{RH}{100}\right),$$

где T_a — температура сухого термометра, $^{\circ}\text{C}$; RH — относительная влажность воздуха, v — скорость ветра, м/с.

О стрессовом состоянии растений судили по изменению содержания пролина в течение холодного периода 2018–2019 гг. в природных условиях. Концентрацию пролина определяли по модифицированной методике Чинарда с использованием нингидринового реактива [28], измерения проводили на спектрофотометре Evolution 220 UV/VIS (Thermo Scientific, США).

Содержание фенольных соединений определяли во всех вариантах опытов. Контролем служили побеги, отобранные на коллекционных участках Никитского ботанического сада. Концентрации олеuropeина, рутина и цинарозида определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [29] на хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США) с диодноматричным детектором DAD-3000. Для проведения анализа была использована аналитическая хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 мм $\times$ 250 мм $\times$ 5 мкм). Применяли градиентный режим элюирования, компонент В подвижной фазы — ацетонитрил, компонент С — 0.1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде: 0–5 мин — 5% В, 5–35 мин — подъем от 5 до 30% В, 35–40 мин — подъем от 30 до 90% В, 40–41 мин — подъем до 100% В, 41–46 мин — 100% В, 46–51 мин — снижение от 100% В до 5% В, 51–55 мин — 5% В. Скорость потока составляла 0.7 мл/мин, температура термостата колонки 400°C , объем пробы 7 мкл. Идентификацию пиков производили на основании совпадения времени удерживания аналита и стандартного образца, а также совпадения УФ-спектров. Расчет количественного содержания индивидуальных

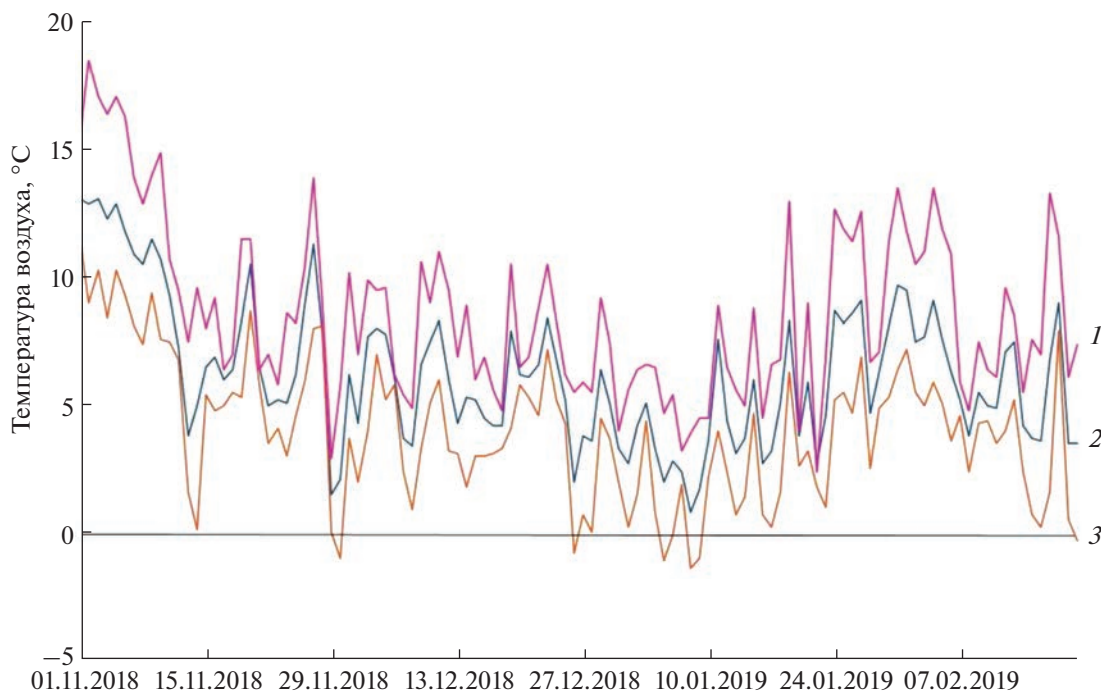


Рис. 1. Ход суточных температур воздуха в ноябре-феврале 2018-2019 гг. на Южном берегу Крыма, согласно данным агрометеостанции “Никитский ботанический сад”. 1 — максимальная температура воздуха, 2 — среднесуточная температура воздуха, 3 — минимальная температура воздуха.

компонентов производили по калибровочным графикам зависимости площади пика от концентрации вещества, построенным по растворам индивидуальных веществ. В качестве стандартов использовали цинарозид, олеуропеин и рутин (Sigma-Aldrich, США). Для обеспечения однородности результатов содержание компонентов рассчитывали в пересчете на сухой вес.

Визуальную оценку интенсивности морозных повреждений (в виде некрозов и изменения окраски листовой поверхности) осуществляли по мере их появления — на 5–7 сутки, а определение фенольных веществ проводили спустя 24 ч после действия стрессового фактора. Эксперименты проводили в 3-кратной биологической и в 3-кратной аналитической повторностях. Для статистической обработки и факторного анализа (ANOVA) использовали программы MS Excel 2007 и Statistica 6.0. В таблице и на графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведены исследования по определению содержания фенольных веществ в листьях *O. europaea* в природных условиях и в лабораторном эксперименте при различных температурных режимах.

Большие сложности в изучении адаптивных процессов у многолетних древесных интродуцентов связаны с тем, что произрастая за пределами

природного ареала, они испытывают хронический стресс. Этот факт обуславливает необходимость учитывать влияние погоды в периоды отбора проб. Установлено, что во второй декаде ноября за 10 дней до отбора проб среднее значение ЭЭТ составило минус 0.89°C. Реальная температура воздуха не опускалась ниже 0°C, а среднедекадная была 7.6°C. Такие условия соответствовали прохождению первой фазы низкотемпературного закаливания. С целью определения глубины стрессового состояния проводили анализ содержания пролина у изучаемых генотипов в течение холодного периода 2018-2019 гг. (табл. 1). По данному показателю генотипы распределились следующим образом: максимум был отмечен у *O. europaea* subsp. *cuspidata*, а минимум — у сортов Кореджиоло и Раццо. Высокий уровень пролина в листьях *O. europaea* subsp. *cuspidata* сохранялся в течение всего холодного периода, что свидетельствует о хроническом стрессовом состоянии. Отдельное внимание уделялось сравнению содержания фенольных веществ в листьях маслины в природных условиях. Если олеуропеин в листьях *O. europaea* subsp. *cuspidata* был обнаружен в следовых количествах, то у сортов Асколяно и Раццо выявлен максимум его содержания (рис. 2). Высокое содержание рутина и цинарозида было отмечено у *O. europaea* subsp. *cuspidata* на фоне следовых количеств олеуропеина. Отличительной особенностью сортов маслины европейской ока-

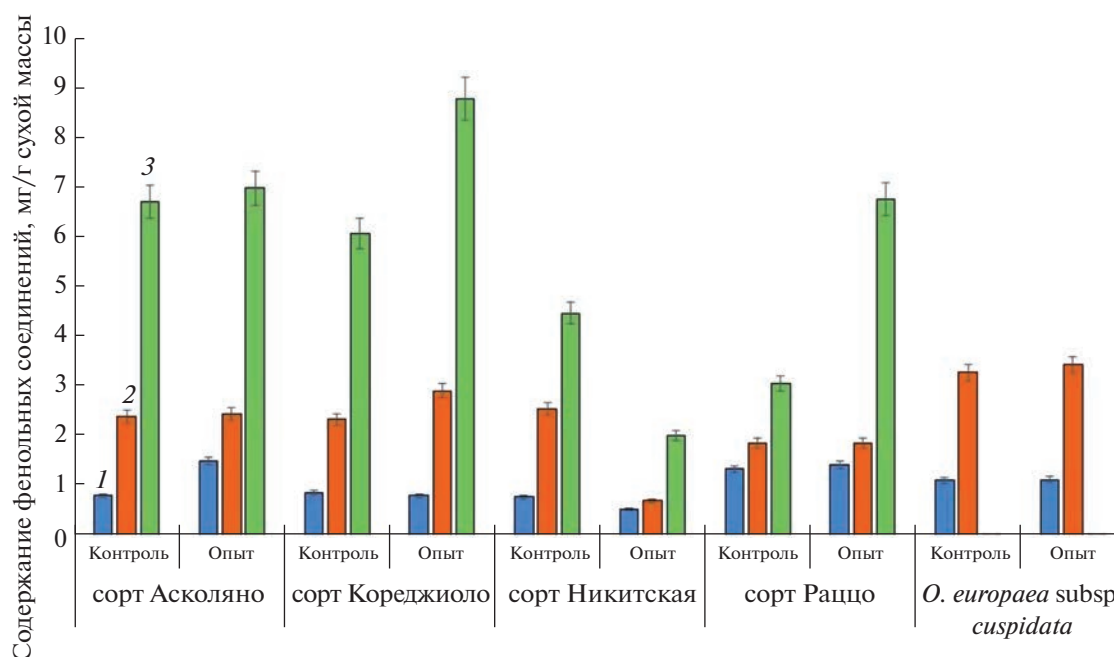


Рис. 2. Изменение содержания фенольных соединений в листьях генотипов *O. europaea* при действии низких температур (вариант 1). 1 – рутин, 2 – цинарозид, 3 – олеуропеин. Контроль – побеги, отобранные на коллекционных участках Никитского ботанического сада. Опыт – побеги, которые охлаждали в климатической камере до 0°C (скоростью охлаждения 2°C/ч) и выдерживали в течение 6 ч. Далее температуру в камере снижали с той же скоростью до –8°C, побеги выдерживали в течение 8 ч. После чего температуру повышали до 10°C, побеги извлекали и через 24 ч определяли содержание рутина, цинарозида и олеуропеина в листьях.

зался низкий уровень накопления рутина, исключение составил сорт Никитская.

В этот же период был проведен модельный эксперимент (вариант 1), имитирующий условия холодовой адаптации *O. europaea*. Обнаружено, что морозные повреждения листьев у сорта Никитская отсутствовали, при этом содержание олеуропеина возрастало в 2 раза (рис. 2), в то время как содержание рутина и цинарозида оставалось неизменным. У сорта Асколяно и Раццо было повреждено не более 5% поверхности листьев, при этом содержание фенольных веществ изменялось разнонаправленно. У сорта Асколяно уровень ру-

тина вырос на 46%, а содержание цинарозида и олеуропеина оставалось прежним (рис. 2). Напротив, у сорта Раццо неизменным было содержание рутина, тогда как содержание цинарозида и олеуропеина увеличилось на 20 и 31%, соответственно. Более серьезные повреждения от воздействия отрицательных температур были отмечены у листьев маслины сорта Кореджиоло (до 15%) и сопровождались снижением содержания всех фенольных веществ, особенно цинарозида (на 72%). У неустойчивого к действию отрицательных температур подвида *O. europaea subsp. cuspidata* на фоне 30% поврежденных листьев со-

Таблица 1. Динамика содержания пролина (мкг/г сухой массы) в листьях генотипов *O. europaea* в течение холодного периода на Южном берегу Крыма

Срок отбора проб	Сорт Асколяно	Сорт Кореджиоло	Сорт Никитская	Сорт Раццо	<i>O. europaea subsp. cuspidata</i>
II декада ноября	47.8 ± 1.9 ^б	34.2 ± 1.5 ^б	51.3 ± 2.4 ^б	32.1 ± 1.6 ^б	64.2 ± 3.2 ^а
II декада декабря	52.3 ± 2.6 ^{а,б}	43.1 ± 2.1 ^а	72.7 ± 3.6 ^а	55.0 ± 2.6 ^а	65.0 ± 3.1 ^а
II декада января	47.8 ± 2.3 ^б	38.5 ± 1.5 ^б	53.3 ± 2.3 ^б	51.6 ± 2.1 ^а	64.7 ± 3.3 ^а
I декада февраля	55.6 ± 2.5 ^а	42.8 ± 2.1 ^а	29.9 ± 1.5 ^б	41.1 ± 2.0 ^б	59.9 ± 2.9 ^а

Примечание. Определение содержания пролина в листьях осуществляли в день опытов по имитации действия отрицательных температур в контролируемых условиях. Пробы отбирали в коллекционных насаждениях *O. europaea* Никитского ботанического сада. Приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверные различия на уровне $P < 0.05$ для каждого генотипа отмечены разными буквами.

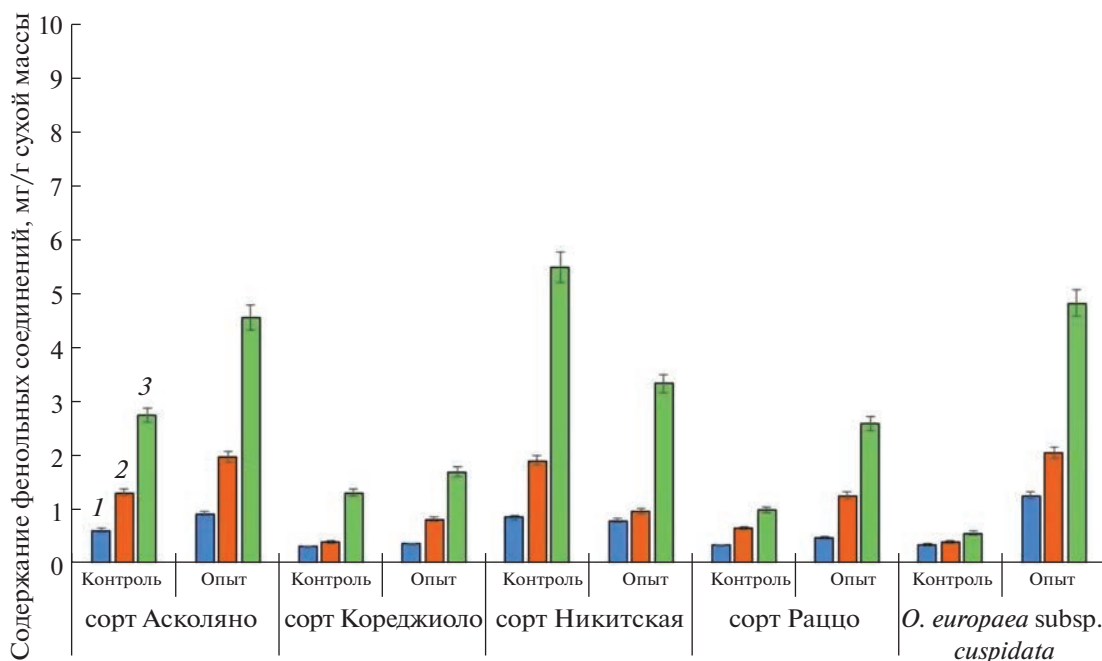


Рис. 3. Изменение содержания фенольных соединений в листьях генотипов *O. europaea* в условиях воздействия низких температур (вариант 2). 1 — рутин, 2 — цинарозид, 3 — олеуропеин. Контроль — побеги, отобранные на коллекционных участках Никитского ботанического сада. Опыт — побеги, которые охлаждали в климатической камере до 0°C (скорость охлаждения 2°C/ч) и выдерживали в течение 6 ч. Далее температуру в камере снижали с той же скоростью до –2°C, побеги выдерживали в течение 6 ч. После чего продолжили снижать температуру с той же скоростью до –8°C, экспозиция 8 ч. Затем температуру повышали до 10°C, побеги извлекали и через 24 ч определяли содержание рутина, цинарозида и олеуропеина в листьях.

держание фенольных веществ не менялось. Таким образом, наличие условий для прохождения первой фазы закаливания морозостойким сортом Никитская и среднестойким сортом Раццо стимулировало синтез олеуропеина, тогда как у слабостойкого сорта Кореджиоло активации биосинтеза не происходило. В данном случае, вероятно, олеуропеин расходовался, в следствие развития стрессового состояния.

Во второй декаде декабря погодные условия существенно изменились. Среднедекадная температура воздуха составила 4.7°C, а количество дней со скоростью ветра 8–10 м/с достигло 7, в результате чего ЭТТ опустилась до минус 7.2°C, что соответствовало значениям начальной повреждающей температуры для среднестойких сортов маслины и критической для слабоустойчивого подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata*. Сложившиеся условия способствовали увеличению содержания пролина у среднестойких сортов и морозоустойчивого Никитская. Практически не изменился уровень этой аминокислоты у слабостойкого сорта Кореджиоло и *O. europaea* subsp. *cuspidata*. С нашей точки зрения, такая картина свидетельствует об активации защитных механизмов у устойчивых сортов, поскольку пролин является элементом антиоксидантной системы растений, а низкотемпературный стресс связан с интенсифика-

цией процессов ПОЛ [30]. Анализ содержания фенольных соединений показал, что оно значительно снизилось у всех сортов *O. europaea*, что позволяет предположить активное участие этих веществ в реализации защитных механизмов от негативного влияния отрицательных температур (рис. 3). В то же время падение среднедекадной температуры воздуха до 4.8°C, а ЭТТ до минус 7.8°C вызвало у *O. europaea* subsp. *cuspidata* резкое повышение уровня олеуропеина, на фоне сохранения высокого содержания пролина и значительного снижения количества флавоноидов, что, вероятно, связано с развитием глубокого стрессового состояния и слабо выраженной способностью к закаливанию.

В опытах с влиянием отрицательных температур, близких к 0°C (вариант 2) наблюдалась интенсификация морозных повреждений и, соответственно, снижение устойчивости у всех исследуемых генотипов маслины. У сорта Никитская отмечены повреждения 10% листовой поверхности. При этом содержание фенольных веществ снижалось следующим образом: рутин на 7%, олеуропеина на 39%, цинарозида — в 2 раза (рис. 3). Повреждения у сортов Кореджиоло и Раццо достигали 30%, а содержание всех исследуемых фенольных соединений увеличилось, в большей степени цинарозида. У сорта Асколяно поврежде-

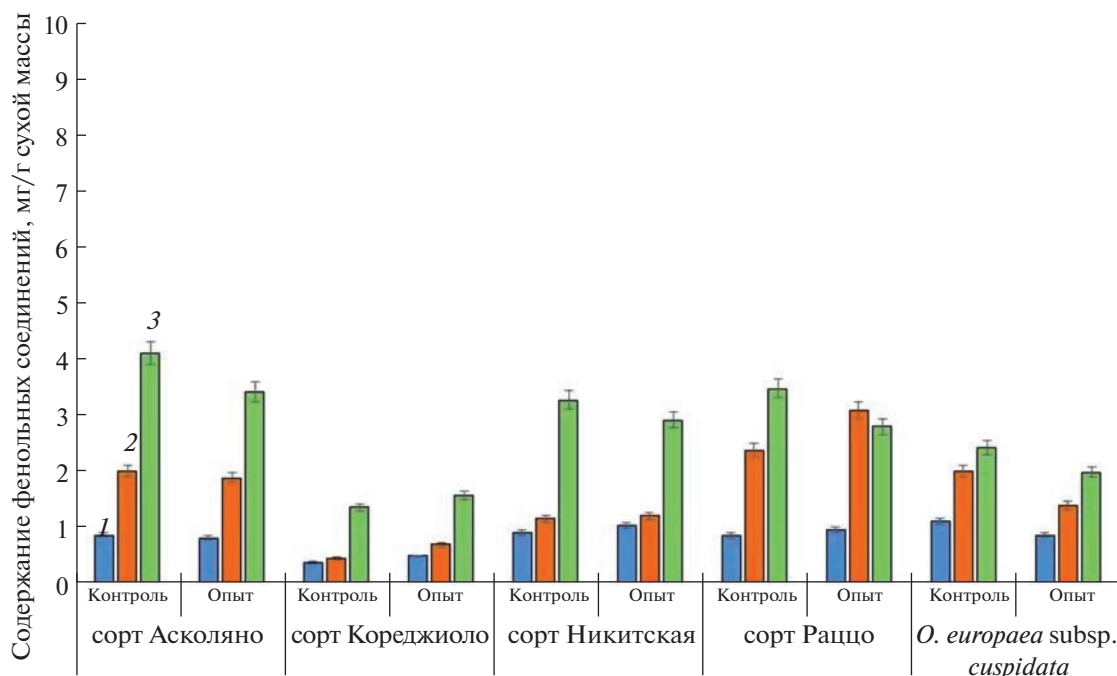


Рис. 4. Изменение содержания фенольных соединений в листьях генотипов *O. europaea* в условиях воздействия низкой отрицательной температуры (-8°C , 8 ч) (вариант 3). 1 – рутин, 2 – цинарозид, 3 – олеуропеин. Контроль – побеги, отобранные на коллекционных участках Никитского ботанического сада. Опыт – побеги, которые охлаждали в климатической камере до -8°C (скорость охлаждения $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$) и выдерживали в течение 8 ч. Далее температуру повышали с той же скоростью до 10°C . Побеги извлекали и через 24 ч определяли содержание рутина, цинарозида и олеуропеина в листьях.

лось 20% поверхности листьев, при этом содержание всех фенольных соединений возросло на 31–40%. Листья подвита *O. europaea* subsp. *cuspidata* полностью погибли, однако при их анализе выявлено значительное увеличение уровня фенольных веществ (на 72–88%), что может быть связано с разрушением клеточных структур, поскольку фенольные соединения локализуются в клеточных стенках, межклетниках и вакуолях [31, 32].

На ЮБК самая высокая вероятность наступления отрицательных температур, опасных для субтропических культур, приходится на вторую половину января-февраля, но в последние десятилетия отмечено большое количество теплых зим, когда в январе-феврале с высокой частотой наблюдаются глубокие оттепели. Такие климатические изменения представляют опасность для жизнедеятельности *O. europaea*, так как известно, что фазы “начало верхушечного роста” и “развертывания первых листьев” чрезвычайно лабильны и зависят от температурного фактора [33].

В период исследований во второй декаде января ЭЭТ вновь достигли положительных значений, что, в свою очередь, сказалось на содержании изучаемых биологически активных веществ в листьях генотипов *O. europaea*. У среднестойких Раццо и Асколяно, а также морозостойкого сорта

Никитская наблюдалось снижение уровня пролина (табл. 1) и увеличение содержания фенольных соединений. У сорта Кореджиоло и *O. europaea* subsp. *cuspidata*, имеющих низкую морозоустойчивость, количество пролина практически не изменилось, что свидетельствует о невысокой интенсивности восстановительных процессов. Содержание фенольных соединений увеличивалось у *O. europaea* subsp. *cuspidata*, а у сорта Кореджиоло оставалось на прежнем уровне (рис. 4), что может быть связано как с генотипическими особенностями *O. europaea*, так и с участием фенольных соединений в регуляции ростовых процессов [16, 18, 34].

В связи с этим, для установления роли индивидуальных фенольных соединений в формировании морозоустойчивости *O. europaea* была проведена серия экспериментов по изучению действию температуры -8°C различной продолжительности. При действии -8°C в течение 8 ч (вариант 3) морозоустойчивость исследуемых генотипов *O. europaea* понижалась в ряду: Никитская, Раццо, Асколяно, Кореджиоло, *O. europaea* subsp. *cuspidata*. У листьев сорта Никитская не выявлено повреждений. Спустя 24 ч для этого сорта установлено, что содержание рутина и олеуропеина возрастало относительно контроля на 14 и 11% соответственно (рис. 4), а цинарозида – оставалось неизмен-

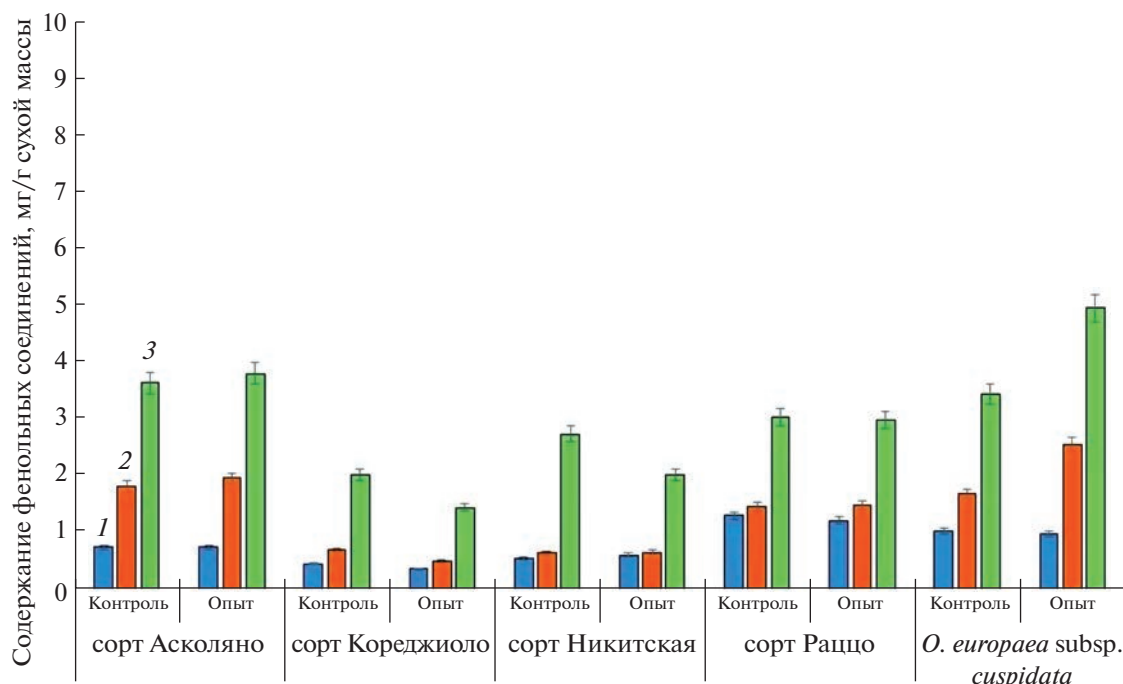


Рис. 5. Изменение содержания фенольных соединений в листьях генотипов *O. europaea* при длительном действии низкой отрицательной температуры (-8°C , 12 ч) (вариант 4). 1 – рутин, 2 – цинарозид, 3 – олеуропеин. Контроль – побеги, отобранные на коллекционных участках Никитского ботанического сада. Опыт – побеги, которые охлаждали в климатической камере до -8°C (скорость охлаждения $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$) и выдерживали в течение 12 ч. Далее температуру повышали с той же скоростью до 10°C . Побеги извлекали и через 24 ч определяли содержание рутина, цинарозида и олеуропеина в листьях.

ным. В этих условиях у сорта Раццо, при 15% повреждения поверхности листьев, увеличивалось содержание рутина и цинарозида на 10 и 23%, а олеуропеина – снижалось на 20%. Морозные повреждения у сортов Асколяно и Кореджиоло проявлялись в виде некротических пятен, занимавших в среднем 20–23% поверхности листа. Несмотря на то, что сорта Асколяно и Кореджиоло были близки по степени морозных повреждений листьев, в отношении содержания фенольных соединений выявлены существенные различия. У сорта Асколяно содержание рутина и цинарозида снижалось на 5–6%, олеуропеина на 17%, а у сорта Кореджиоло, наоборот, происходило увеличение содержания фенольных соединений (рутина на 22%, цинарозида на 36%, олеуропеина на 13%). При сравнении контрольных значений уровня фенольных веществ выявлено, что у сорта Кореджиоло содержание олеуропеина было минимальным. У подвида *O. europaea subsp. cuspidata* при действии температуры -8°C в течение 8 ч повредилось 40% поверхности листьев. При этом наблюдалось снижение содержания рутина на 22%, цинарозида – на 33%, олеуропеина – на 17% (рис. 4).

Прохождение холодного фронта в конце января – начале февраля привело к снижению ЭЭТ до значений, близких к 0°C . В этих условиях было выявлено, что у интродуцированных сортов *O. eu-*

ropea содержание пролина изменялось в пределах 10–17%, у сорта местной селекции Никитская уровень пролина оставался прежним (табл. 1). Такая картина, видимо, обусловлена пролонгированным действием стрессовых условий окружающей среды. У относительно устойчивых к отрицательным температурам генотипов *O. europaea* содержание фенольных соединений снизилось, что вероятно, связано с их участием в процессах адаптации к изменившимся погодным условиям, поскольку в предшествующий период исследований оттепель нивелировала закалку (рис. 5). У слаботойких подвида *O. europaea subsp. cuspidata* и сорта Кореджиоло содержание цинарозида и олеуропеина, напротив, увеличивалось.

Понятие критические и начальные повреждающие температуры в некоторой степени условны, т.к. при более длительном времени экспозиции действие начальной повреждающей температуры может носить критический или даже летальный характер. В связи с этим был проведен опыт по изучению влияния температуры -8°C в течение 12 ч (вариант 4) на однолетние побеги генотипов *O. europaea*, показавший, что увеличение времени действия низкой температуры снижает степень морозостойкости у всех изучаемых генотипов (рис. 5).

В более жестких условиях наблюдались повреждения у 20% листьев сорта Никитская. Содержа-

ние рутина не изменялось относительно контроля, цинарозида незначительно возрастало (на 10%), олеуропеина снижалось на 26% (рис. 4). В данном случае в отношении флавоноидов рутина и цинарозида у сорта Никитская сохранилась тенденция, аналогичная для режима -8°C в течение 8 ч, а содержание олеуропеина снижалось более чем в 2 раза.

У сорта Асколяно морозные повреждения были выявлены у 35% листьев, при этом содержание фенольных веществ изменялось незначительно (3–7%). Листья сорта Кореджиоло повреждались на 40%, а содержание рутина в них снижалась на 22%, цинарозида на 27%, олеуропеина на 28%. У сорта Раццо повредилось 30% листовой поверхности, а содержание рутина оказалось на 22% ниже контроля, а цинарозида и олеуропеина оставалось неизменным. Повреждение 70% поверхности листа у подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* сопровождалось ростом содержания цинарозида и олеуропеина на 34 и 31%, соответственно.

Таким образом, при длительном стрессовом воздействии у среднестойких и морозоустойчивого сортов содержание флавоноидов практически не изменялось, а содержание олеуропеина снижалось только у сорта Никитская. Возрастание уровня цинарозида и олеуропеина у неустойчивого подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* возможно связано с высокой интенсивностью морозных повреждений, а не формированием защитных механизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что пролонгированное действие температуры 0°C стимулировало начальные этапы низкотемпературной адаптации и, соответственно, положительно влияли на зимостойкость представителей *O. europaea*, особенно выражено у генотипов с невысокой устойчивостью. В то же время, действие отрицательных не повреждающих температур, близких к 0°C , негативно сказывалось на их морозостойкости, а именно, способствовали развитию более глубокого стрессового состояния.

Исследования ряда авторов показали, что при действии 0°C у устойчивых сортов *O. europaea* содержание олеуропеина возрастало [18]. Аналогичные результаты были получены и в наших исследованиях. Также нами выявлена связь изменения содержания фенольных соединений со степенью повреждения листьев маслины, а именно: у сортов Асколяно и Раццо с незначительными повреждениями листьев наблюдалась активация биосинтеза флавоноидов и олеуропеина. У сорта Кореджиоло с более сильными морозными повреждениями фенольные вещества активно расходовались, а следовые количества олеуропеина и отсутствие изменений в содержании рутина и цинарозида у

подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* связаны с его менее тесными родственными связями с *O. europaea* и высокой чувствительностью морозу.

Наблюдавшееся увеличение содержания фенольных веществ при действии отрицательных не повреждающих температур (вариант 2) у всех генотипов за исключением сорта Никитская связано тем, что у устойчивого сорта активация биосинтеза фенольных веществ произошла раньше и это позволило ему, при нарастающем действии отрицательных температур, активно расходовать эти вещества для нивелирования негативных последствий стресса. А у средне- и слабостойких генотипов интенсификация биосинтеза происходила непосредственно во время действия отрицательных температур, вследствие чего вновь образовавшиеся вещества не успевали выполнять свою защитную функцию. На этом основании нами сделано предположение о том, что у генотипов с низкой степенью морозоустойчивости синтез фенольных соединений активируется лишь в момент действия стрессового фактора, что не позволяет им своевременно к нему адаптироваться. В то время как у относительно устойчивых сортов эти процессы начинались на более ранних этапах низкотемпературной адаптации.

При сравнении результатов, полученных в опытах с действием температуры -8°C в течение 8 и 12 ч установлено, что такое длительное воздействие низкой отрицательной температуры является начальным повреждающим фактором для морозоустойчивого сорта Никитская, критическим — для сортов Кореджиоло, Раццо и Асколяно, а для *O. europaea* subsp. *cuspidata* — летальным. Выявлены различия в синтезе фенольных соединений, которые связаны не только со степенью морозостойкости, но и с сортоспецифичностью генотипов *O. europaea*. У сорта Никитская в варианте 3 накапливался рутин и олеуропеин, а в варианте 4 их содержание снижалось. В то время как у среднестойких сортов в критических условиях (вариант 4) содержание данных веществ мало изменялось, что можно объяснить температурной чувствительностью комплекса ферментов, обеспечивающего участие фенольных соединений в защитных механизмах. Косвенным подтверждением сделанного предположения служит имеющаяся в научной литературе информация о высокой чувствительности полифенолоксидазы маслины европейской к низким положительным и отрицательным температурам [14, 18].

Полученные данные позволяют предположить, что у *O. europaea* при разных температурных режимах все изученные фенольные соединения принимают участие в формировании устойчивости к отрицательным температурам. Однако доминирующая роль принадлежит секоиридоиду олеуропеину, специфичному для семейства Oleaceae.

Синтез олеуропеина происходит по иридоидному пути, и является сложным, многоступенчатым процессом, все этапы которого полностью не раскрыты [13]. Известно, что олеуропеин является гидрофильным соединением [9] и, соответственно, может выполнять функцию криопротектора, понижая температуру льдообразования. Он проявляет сильные антиоксидантные свойства, тем самым защищая клеточные структуры от повреждений АФК, т.к. интенсификация процессов ПОЛ при низкотемпературном стрессе характерна для многих видов растений [35]. Кратковременные и длительные воздействия отрицательных температур влияют на профиль экспрессии генов растений, в том числе и *O. europaea*. В настоящее время выявлено, что низкотемпературный стресс в растениях маслины приводит к изменению экспрессии генов, отвечающих за синтез гидрокситирозола (предшественника олеуропеина) и олеуропеина, при этом у устойчивых сортов экспрессия увеличивается, а у неустойчивых ингибируется [17, 18].

Накапливаясь во время низкотемпературного воздействия в растительных клетках и тканях полифенолы, помимо антиоксидантного действия, могут выполнять также запасующую функцию. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что флавоноиды в свободном состоянии встречаются редко, в основном они представлены в форме гликозидов, способных выступать в качестве резервных веществ в метаболизме растений [34, 36]. Поэтому гликозиды флавоноидов можно рассматривать как пул агликонов, которые будут отщепляться от гликозидов в случае необходимости [37], тогда как сахарный остаток может служить своеобразной формой запасания сахаров.

Важное значение для формирования зимостойкости субтропических растений, к которым относится *O. europaea*, имеют даты устойчивого перехода температур через именно 5°C, и особенно, 10°C в сторону понижения, поскольку с ними связаны сроки окончания вегетации и завершения ростовых процессов. Однако на ЮБК, в результате потепления климата, в последние десятилетия отмечена тенденция сокращения продолжительности периода с температурами ниже 5°C в холодное время года, что приводит к сокращению осеннего сезона и увеличению продолжительности вегетации [38]. Такие климатические изменения представляют опасность для жизнедеятельности *O. europaea*. В научной литературе крайне мало информации о наличии у *O. europaea* эндогенного покоя, а также его продолжительности и глубине. Есть единичные исследования, в которых авторам удалось установить, что у этого вида индукция покоя контролируется не фотопериодом, а низкими температурами [39]. При этом, этот покой легко обратим после недолгого

повышения температур, независимо от начальной даты холодного воздействия. Известно, что фенольные соединения принимают участие в регуляции роста, и в зависимости от концентрации, могут выполнять ингибирующую или активирующую функцию [34]. Сопоставление этих данных и результатов наших исследований позволило предположить, что фенольные соединения принимают многогранное участие в реализации процессов зимостойкости у *O. europaea*.

Таким образом, установлено, что рутин, цинарозид и олеуропеин являются элементами механизмов защиты маслины от негативного влияния отрицательных температур. В формировании морозоустойчивости данные вещества выполняют роль криопротекторов и антиоксидантов, а при формировании зимостойкости важным является, на каком этапе происходит активация биосинтеза — до начала или непосредственно во время действия отрицательных температур. Ярким примером служит слабоустойчивый подвид *O. europaea* subsp. *cuspidata*, у которого олеуропеин как в природных, так и в лабораторных условиях накапливался только при понижении температуры до отрицательных значений. Анализ динамики содержания пролина в листьях *O. europaea* в течение холодного периода на ЮБК позволяет использовать этот показатель, как уровень стрессового состояния растений маслины в природных условиях.

Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования “Физиолого-биохимические методы исследования растительных объектов” Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Никитский ботанический сад — Национальный научный центр” (Ялта, Россия).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефимов В.В., Володин Е.М., Анисимов А.Е. Моделирование изменений климата в Черноморском регионе в XXI столетии // Морской гидрофизический журн. 2015. № 2. С. 3. <https://doi.org/10.22449/0233-7584-2015-2-3-14>
2. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. Москва: Наука, 1979. 352 с.
3. Петров К.А. Криорезистентность растений: эколого-физиологические и биохимические аспекты. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2016. 275 с.
4. Sin'kevich M.S., Naraikina N.V., Trunova T.I. Processes hindering activation of lipid peroxidation in cold-tolerant plants under hypothermia // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 1020. <https://doi.org/10.1134/S1021443711050232>

5. Sharma P., Jha A., Dubey R., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // J. Bot. 2012. Article ID 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
6. Ortega-Garcia F., Peragon J. Phenol metabolism in the leaves of the olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during Ripening // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 12440. <https://doi.org/10.1021/jf102827m>
7. Talhaoui N., Taamalli A., Gomez-Caravaca A.M., Fernandez-Gutierrez A., Segura-Carretero A. Phenolic compounds in olive leaves: analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits // Food Res. Int. 2015. V. 77. P. 92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
8. Petrucci R., Bartolini G., Ganino T., Zelasco S., Lombardo L., Perri E., Durante M., Bernardi R. Cold stress, freezing adaptation, varietal susceptibility of *Olea europaea* L. // Plants. 2022. V. 11. P. 1367. <https://doi.org/10.3390/plants11101367>
9. Otero D., Lorini A., Oliveira F., Antunes B., Oliveira R., Zambiazzi R. Leaves of *Olea europaea* L. as a source of oleuropein: characteristics and biological aspects // Res. Soc. Dev. 2021. V. 10:e185101321130. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21130>
10. Alagna F., Geu-Flores F., Kries H., Panara F., Baldoni L., O'Connor S.E., Osbourn A. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropein biosynthesis in olive (*Olea europaea*) fruits // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 5542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701276>
11. Panizzi L., Scarpati M.L., Oriente E.G. Structure of the bitter glucoside oleuropein. Note II. // Gazz. Chim. Ital. 1960. V. 90. P. 1449.
12. Bonechi C., Donati A., Tamasi G., Pardini A., Rostom H., Leone G., Lamponi S., Consumi M., Magnani A., Rossi C. Chemical characterization of liposomes containing nutraceutical compounds: tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein // Biophys. Chem. 2019. V. 246. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.01.002>
13. Rao G., Zhang J., Liu X. De novo assembly of a new *Olea europaea* genome accession using nanopore sequencing // Hortic. Res. 2021. V. 8: 64. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00498-y>
14. Ortega-García F., Peragón J. The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual) // J. Sci. Food Agric. 2009. V. 89. P. 1565. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3625>
15. Raimbault A.K., Marie-Alphonsine P.A., Horry J.P., Francois-Haugrin M., Romuald K., Soler A. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. P. 342. <https://doi.org/10.1021/jf102511z>
16. Hashempour A., Ghasemnezhad M., Ghazvini R.F., Sohani M.M. Olive (*Olea europaea* L.) freezing tolerance related to antioxidant enzymes activity during cold acclimation and non acclimation // Acta Physiol. Plant. 2014. V. 36. P. 3231. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1689-3>
17. Mougou N., Baalbaki B., Doupis G., Kavroulakis N., Poullos S., Vlachonasios K., Koubouris G. The effect of low temperature on physiological, biochemical and flowering functions of olive tree in relation to genotype // Sustainability. 2020. V. 12. P. 10065. <https://doi.org/10.3390/su122310065>
18. Jiang C., Hu W., Lu H., Chen L., Niu E., Zhu S., Shen G. Alterations of phenotype, physiology, and functional substances reveal the chilling-tolerant mechanism in two common *Olea europaea* cultivars // Front. Plant Sci. 2023. V. 14: 1046719. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1046719>
19. Afanas'ev I., Dorozhko A.I., Brodskii A., Kostyuk V., Potapovitch A. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of Rutin and Qercetin in lipid peroxidation // Biochem. Pharmacol. 1989. V. 38. P. 1763. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90410-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3)
20. Mechri B., Tekaya M., Hammami M., Chehab H. Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*) // Biochem. Syst. Ecol. 2020. V. 92: 104112. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104112>
21. Genzel F., Dichke M.D., Junker-Frohn L.V., Neuwohner A., Thiele B., Putz A., Usadel B., Wormit A., Wiese-Klinkenberg A. Impact of moderate cold and salt stress on the accumulation of antioxidant flavonoids in the leaves of two capsicum cultivars // J. Agric. Food Chem. 2021. V. 69. P. 6431. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00908>
22. Hodaei M., Rahimmalek M., Arzani A., Talebi M. The effect of water stress on phytochemical accumulation, bioactive compounds and expression of key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Chrysanthemum morifolium* L. // Ind. Crops Prod. 2018. V. 120. P. 295. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.073>
23. Палий А.Е., Палий И.Н., Федотова И.А., Мелкозерова Е.А., Цюпка С.Ю., Гребенникова О.А. Динамика фенольных соединений в листьях маслины европейской в холодный период на Южном берегу Крыма // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2019. № 133. С. 51. <https://doi.org/10.36305/0513-1634-2019-133-51-56>
24. Губанова Т.Б., Браилко В.А., Мязина Л.Ф. Зимостойкость некоторых видов семейства Oleaceae в коллекции Никитского ботанического сада // Нортус botanicus. 2018. Т. 13. С. 250. <https://doi.org/10.15393/j4.art.2018.5784>
25. Лищук А.И. Физиологические и биофизические методы в селекции плодовых культур: методические рекомендации. Москва: ВАСХНИЛ, 1991. 58 с.
26. Корсакова С.П. Обзор стихийных гидрометеорологических явлений в районе Никитского ботанического сада // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. 2014. Т. 139. С. 79.
27. Врублевська О.О., Катеруша Г.П. Прикладна кліматологія. Конспект лекцій. Дніпропетровськ: Економіка, 2005. 131 с.
28. Андрущенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon*

- Tourn // Известия АН Молдавской ССР. Серия биол. и хим. наук. 1981. № 4. С. 55.
29. Plazonic A., Bucar F., Males Z., Mornar A., Nigovi B., Kujundzic N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry // *Molecules*. 2009. V. 14. № 7. P. 2466.
<https://doi.org/10.3390/molecules14072466>
 30. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci*. 2002. V. 7. P. 405.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
 31. Haratym W., Weryszko-Chmielewska E., Konarska A. Microstructural and histochemical analysis of aboveground organs of *Centaurea cyanus* used in herbal medicine // *Protoplasma*. 2020. V. 257. P. 285.
<https://doi.org/10.1007/s00709-019-01437-4>
 32. Зайцева С.М., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., Берковская И.А., Белевцова А.С., Щербакова А.А. Гистохимическое определение локализации флавоноидов в эпидермальных тканях лекарственных растений *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Taxus canadensis* Marsh, *Ginkgo biloba*, *Helianthus annuus* L. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2022. Т. 2. С. 66.
<https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202202009>
 33. Korsakova S., Korsakov P. Features development of olive trees during the growing season in the Southern coast of the Crimea // *BIO Web Conf*. 2021. V. 38: 00060.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20213800060>
 34. Запроматов М.Н. О функциональной роли фенольных соединений в растениях // Физиология растений. 1992. Т. 39. С. 1197.
 35. Fahimirad S., Karimzadeh G., Ghanati F. Cold-induced changes of antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars // *J. Plant Physiol. Breed*. 2013. V. 3. P. 1.
 36. Olenichenko N.A., Ossipov V.I., Zagorskina N.V. Effect of cold hardening on the phenolic complex of winter wheat leaves // *Russ. J. Plant Physiol*. 2006. V. 53. P. 495.
<https://doi.org/10.1134/S1021443706040108>
 37. Janas K.M., Cvikrova M., Palagiewicz A., Szafranska K., Posmyk M.M. Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature // *Plant Sci*. 2002. V. 163. P. 369.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00136-X)
 38. Корсакова С.П., Корсаков П.Б. Динамика временных границ климатических сезонов на Южном берегу Крыма в условиях изменения климата // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2018. № 127. С. 100.
<https://doi.org/10.25684/NBG.boolt.127.2018.15>
 39. Lopez-Bernal A., Garcia-Tejera O., Testi L., Orgaz F., Villalobos F. Studying and modelling winter dormancy in olive trees // *Agric. For. Meteorol*. 2020. V. 280: 107776.
<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.107776>

УДК 581.1;582.29;547.92

СТЕРИНОВЫЙ СОСТАВ ЛИШАЙНИКА *Peltigera canina* ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР

© 2023 г. Ю. Н. Валитова^{а, *}, В. Р. Хабибрахманова^{а, b}, В. М. Бабаев^с, В. Л. Уваева^а,
А. Ф. Хайруллина^а, Д. Ф. Рахматуллина^а, Е. И. Галеева^а, М. А. Свид^а, Ф. В. Минибаева^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра
Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

*e-mail: yulavalitova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 04.11.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

В настоящее время особое внимание уделяется исследованию механизмов стрессовой устойчивости организмов-экстремофилов, способных выживать в экстремальных условиях. К таким организмам относятся лишайники, представляющие собой симбиотические ассоциации грибов и водорослей и/или цианобактерий. Высокая стрессовая устойчивость лишайников обусловлена наличием у них широкого спектра биологически активных метаболитов, в том числе стерина. Известно, что лишайники обладают разнообразным и уникальным стеринным составом, отличающимся от такового у грибов и водорослей. Стерин-опосредованные биохимические механизмы стрессовой устойчивости лишайников изучены недостаточно полно и не систематизированы. Температурный стресс является достаточно привычным для лишайников, часто произрастающих в неблагоприятных условиях. Известно, что сухие талломы лишайников способны выдерживать изменения температур в больших диапазонах, тогда как гидратированные талломы гораздо более чувствительны к действию неблагоприятных температур. В настоящей работе были исследованы стресс-индуцированные изменения дыхательной активности и индекса мембранной стабильности (ИМС), а также стеринового профиля гидратированных талломов лишайника *Peltigera canina* (L.) Willd. при действии повышенной (+40°C) и пониженной (–20°C) температур. Было показано, что неблагоприятные температуры вызывали подавление интенсивности дыхания и снижение ИМС талломов лишайника. Хроматомасс-спектрометрический анализ показал наличие у лишайника *P. canina* эргостерина, дегидроэргостерина, эпистерина, лихестерина и фунгистерина. При действии обоих стрессовых факторов происходило снижение уровня эргостерина и увеличение доли эпистерина. В условиях холодового стресса также увеличивалась доля дегидроэргостерина, доля лихестерина снижалась, а относительное содержание более насыщенного стерина фунгистерина оставалось на контрольном уровне. Можно полагать, что стресс-индуцированные изменения стеринового профиля лишайника при низкотемпературном воздействии создают оптимальный баланс стерина в мембранах, который обеспечивает условия для разворачивания успешной стратегии, ведущей к адаптации лишайника к действию стрессора.

Ключевые слова: *Peltigera canina*, лишайники, стерина, фосфолипиды, ИМС, дыхание, температурный стресс

DOI: 10.31857/S0015330323600997, **EDN:** BGZAUW

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники представляют собой симбиотические ассоциации между грибом (микобионтом) и водорослью и/или цианобактерией (фотобион-

том) и являются экстремофильными организмами, так как способны выживать в крайне неблагоприятных условиях посредством уникальных механизмов устойчивости [1–4]. Температурный стресс является достаточно привычным для лишайников, которые могут произрастать как в полярных районах Земли, так и в жарких и засушливых регионах. Известно, что в сухом виде лишайни-

Сокращения: ИМС – индекс мембранной стабильности, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФК – фосфатидная кислота, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин.

ки способны переносить изменения температур в большом диапазоне, тогда как гидратированные талломы лишайников гораздо более чувствительны к действию неблагоприятных температур. Исследование термостойкости микобионтов и фикобионтов, выделенных из пустынных лишайников *Endocarpon pusillum*, *Acarospora nodulosa* и *A. schleicheri*, показало, что во влажных условиях они могут переносить температуру 50°C. Однако, в условиях засухи микобионт и фикобионт *E. pusillum* могут переносить температуру 75°C, а микобионты двух других лишайников могут переносить температуру 80°C [5]. Хорошо известна устойчивость лишайников к низким температурам, обусловленная наличием криопротекторов в их талломах [6, 7]. Показано, что даже при очень низких температурах у лишайников активно протекают метаболические процессы. В частности, у некоторых видов лишайников процессы дыхания и фотосинтеза могут протекать при температурах –12°C и –24°C, соответственно [8]. Пельтигеровые лишайники, которые произрастают в более мягких, по сравнению с Антарктикой, условиях, не обладают повышенной устойчивостью к воздействию столь низких температур. Известно, что эти лишайники отличаются высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [9]. В связи с этим, можно предположить, что пельтигеровые лишайники продемонстрируют выраженную реакцию к действию неблагоприятных температур. Высокая стрессовая устойчивость лишайников может быть обусловлена, кроме прочих факторов, уникальным стеринным составом, отличающимся от такового у грибов и водорослей. В настоящее время биохимические механизмы стрессовой устойчивости лишайников, опосредованные изменениями профиля стеринов, изучены недостаточно полно и не систематизированы. В связи с этим, актуальным является идентификация стеринов в лишайниках и выявление изменений в их профиле при действии стрессовых факторов. Понимание молекулярных и биохимических основ стрессовых ответов лишайников посредством регуляции метаболизма стеринов поможет более углубленно и детально разобраться в механизмах стрессовой устойчивости экстремофилов. Целью настоящего исследования было изучение изменений стеринового профиля пельтигерового лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили талломы лишайника *P. canina* (L.) Willd., собранные на территории Республики Татарстан в мае 2022 года. *P. canina* является эпигейным, двухкомпонентным лишайником, фотобионтом которого является цианобактерия *Nostoc punctiforme* (Kütz.)

Nar., а микобионтом – гриб *Peltigera* Willd. (тип *Ascomycota*). После сбора и предварительной очистки талломы лишайника высушивали при комнатной температуре. Высушенный материал помещали в морозильную камеру (–20°C) на хранение до использования в экспериментах.

Талломы лишайника гидратировали в течение 2 сут при температуре +10°C. Перед стрессовой обработкой контейнеры с гидратированными талломами оставляли на 2 ч при комнатной температуре. Для стрессовой обработки чашки Петри с образцами закрывали и помещали в термостат ТСО-1/80 СПУ при температуре +40°C на 3 ч, для воздействия пониженной температурой гидратированные талломы помещали в морозильную камеру при –20°C на 1 ч. Контролем служили гидратированные талломы лишайника, не подвергнутые стрессовой обработке. Оводненность талломов лишайника определяли в каждой временной точке высушиванием до постоянного веса на анализаторе влажности АВГ-60 (Госметр, Россия).

Интенсивность дыхания талломов лишайников определяли манометрическим методом в аппарате Варбурга [10]. Кусочки талломов лишайника после взвешивания (100–150 мг) помещали в сосудики Варбурга с 3 мл дистиллированной воды и после термостатирования в течение 10 мин по показаниям манометров каждые 60 мин в течение 3 ч измеряли потребление кислорода. Постоянство концентрации CO₂ в сосудике обеспечивали добавлением 300 мкл 20% NaOH в отросток сосудика. Дыхание измеряли в течение 3 ч для достижения устойчивого состояния после изменения температуры [11]. Расчеты проводили в мкл O₂ за 1 ч на 1 г сухой массы.

Выход электролитов из тканей лишайника измеряли по стандартной методике [12]. Кусочки таллома лишайника погружали в бюксы с бидистиллированной водой Milli-Q (15 мл) и выдерживали в термостате при комнатной температуре в течение 30 мин. Электропроводность раствора после инкубации (C₁) измеряли с помощью кондуктометра Ohaus ST3100C-B (США). Полный выход электролитов (C₂) определяли по электропроводности того же раствора после разрушения клеточных мембран при температуре 100°C в течение 30 мин.

Индекс мембранной стабильности (ИМС) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМС} = (1 - (C_1 - C_0) / (C_2 - C_0)) \times 100\%,$$

где C₀ – электропроводность бидистиллированной воды, мкСм.

Экстракцию липидов производили методом Блайя и Дайэра [13]. Талломы лишайника растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния, отбирали пробу весом 1 г. Затем проводили

последовательную двухэтапную экстракцию смесью хлороформ–метанол (1 : 2) с обработкой в течение 5 мин в УЗ бане (Сапфир, Россия). Экстракты получали фильтрованием гомогената через фильтр Шотта. К объединенному экстракту добавляли 5 мл хлороформа и 8 мл дистиллированной воды, перемешивали, оставляли до расслоения. Далее с помощью пипетки Пастера отбирали верхний водно-метанольный слой, откидывая его, оставшийся хлороформный слой переносили в круглодонную колбу и упаривали на ротаторном испарителе (IKA RV 8, Германия). Выход липидных веществ определяли гравиметрическим методом [14]. Полученные экстракты до проведения анализов хранили в морозильной камере при температуре -20°C .

Для проведения щелочного гидролиза к экстракту липидов лишайника добавляли 1 М раствора КОН в 80% этаноле и гидролизовали на водяной бане в течение 30 мин при температуре 80°C . После гидролиза к реакционной смеси добавляли 2 мл диэтилового эфира и 3 мл дистиллированной воды, перемешивали, оставляли для разделения на слои (30 мин, 4°C). Затем верхний эфирный слой отделяли и переносили в пробирку для суммарного эфирного экстракта. К нижнему водно-спиртовому слою добавляли еще 2 мл эфира, перемешивали, оставляли для разделения на слои (30 мин, 4°C). Верхний эфирный слой отделяли и соединяли с эфирным экстрактом первой ступени. Экстракцию диэтиловым эфиром повторяли еще один раз аналогично. К суммарному эфирному экстракту добавляли небольшое количество безводного сернокислого натрия (0.01 г), перемешивали и выдерживали в течение 10 мин. После экстракт фильтровали через мембранный фильтр (PTFE, 0.45 μm , Schleicher & Schuell, Германия), эфир выпаривали, сухой остаток количественно переносили в хроматографическую вialу, используя в качестве растворителя метанол. Полученные пробы до проведения анализов хранили в морозильной камере при температуре -20°C .

Газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 N (Agilent Technologies, США). Метод ионизации: электронная ионизация (70 эВ). Температура источника ионов: 230°C . Диапазон масс: 50–800 а. е. м. Капиллярная колонка HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки фазы 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения: объем вводимой пробы — 2 мкл; начальная температура термостата колонки — 60°C , термостатирование при начальной температуре колонки 2 мин, подъем температуры со скоростью $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 300°C , термостатирование при конечной температуре колонки 15 мин; температура узла ввода проб (инжектора) —

300°C ; режим ввода пробы без деления потока, газ-носитель — гелий, расход — 1.5 мл/мин.

К пробе, полученной в ходе щелочного омыления экстракта липидов, добавляли 100 мкл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), отбирали 20 мкл полученного раствора добавляли 5 мкл раствора нафталина (2 мг/мл), используемого в качестве внутреннего стандарта.

Идентификацию компонентов проводили с использованием стандартов стерина — эргостерина, холестерина, стигмастерина (Sigma-Aldrich, США, степень чистоты не менее 95%), библиотеки масс-спектров NIST 17 и литературных данных [15, 16].

Относительное процентное содержание индивидуальных стерина в экстрактах рассчитывали путем определения площади соответствующего пика на ГХ-хроматограмме, как процентной части от общей суммы площадей пиков всех стерина. При этом для компенсации возможных ошибок в ходе ГХ-МС анализа и получения достоверных результатов в расчетах использовали отношение площадей пиков стерина к площади пика нафталина в каждом измерении.

Высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) проводили в автоматизированной системе CAMAG (Швейцария). Для хроматографии использовали пластины Merck KGaA (Германия). Экстракты липидов растворяли в смеси хлороформ–метанол (1 : 1) (5 мг/мл). Для идентификации индивидуальных фосфолипидов использовали стандарт фосфолипидов (Avanti, США). Нанесение экстрактов и стандартов на пластину выполняли на автоматическом аппликаторе Linomat 5 в виде треков шириной 7 мм. Элюирование проводили в автоматической камере ADC 2, линия фронта подвижной фазы — 80 мм. В качестве подвижной фазы использовали хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4). Далее ТСХ-пластины опрыскивали 5% раствором H_2SO_4 в этаноле с помощью пульверизатора (Ленхром, Россия), высушивали и нагревали 20 мин при температуре 150°C . Денситометрическое сканирование ТСХ-пластин после дериватизации проводили на TLC Scanner 4 при параметрах: режим — отражательная абсорбция, длина волны — 490 нм, щель — 6.00×0.40 мм, скорость сканирования — 20 мм/с, разрешение — 100 мкм/шаг, математический фильтр Savitsky-Golay 7. Количественное определение индивидуальных фосфолипидов в исследуемых экстрактах осуществляли по калибровочным уравнениям, полученным для чистых стандартов лизофосфатидилхолина (ЛФХ), фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) (табл. 1).

Опыты проводили в 3–5 биологических и 3–10 аналитических повторностях. Полученные данные представлены в виде средних арифметиче-

Таблица 1. Калибровочные уравнения для количественного определения индивидуальных веществ.

Вещества — стандарты	Количество, мкг	Полученное калибровочное уравнение (по площади пиков)	<i>r</i>
Лизофосфатидилхолин	0.7; 1.4; 2.1	$y = 816 + 1683x$	0.96
Фосфатидилинозитол	1.8; 3.6; 5.4	$y = 1405 + 579x$	0.99
Фосфатидилхолин	3.8; 7.6; 11.4	$y = 4004 + 997x$	0.99
Фосфатидилэтаноламин	3; 6; 9	$y = 3824 + 1097x$	0.99

ских значений со стандартными ошибками (SE). Все экспериментальные данные по количественному определению липидов и каротиноидов имеют нормальное распределение признака. Для сравнения их средних арифметических значений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с оценкой попарных различий с помощью критериев Тьюки, Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ физиологического состояния лишайника P. canina при действии неблагоприятных температур

Первым этапом работы было проведение экспериментов по изучению физиологического состояния лишайника при действии неблагоприятных температур. Стрессовые условия были подобраны в результате серии предварительных экспериментов, в которых были изучены изменения физиологических параметров лишайника при действии различных температур и с разным временем воздействия (данные не представлены). Было обнаружено, что самыми эффективными

температурами, индуцирующими стрессовый ответ лишайника, являются обработка талломов повышенной температурой +40°C в течение 3 ч и низкой отрицательной температурой –20°C в течение 1 ч. Контролем служили предварительно гидратированные талломы лишайника. После обработки талломов неблагоприятными температурами были измерены физиологические параметры: дыхательная активность лишайника и ИМС для оценки состояния мембран. Было показано, что в течение 3 ч после действия повышенной температуры наблюдается значительное подавление дыхания у талломов лишайника (рис. 1). Уровень потребления кислорода прогретыми талломами был на 80–90% ниже по сравнению с контрольным вариантом. Обработка пониженной температурой не вызвала столь значительных изменений дыхательной активности: через 1 ч после стрессового воздействия наблюдалась легкая стимуляция дыхания (на 30%), через 2 ч уровень дыхательной активности был уже чуть ниже контрольного и лишь к третьему часу происходило заметное подавление дыхания на 40%.

Об изменении проницаемости клеточных мембран лишайника судили по выходу электролитов из клеток, по которому рассчитывали индекс мембранной стабильности (ИМС). ИМС достоверно снижался при действии обеих неблагоприятных температур (рис. 2). Через 1 ч после действия стресса в талломах лишайника, обработанного отрицательной температурой, ИМС клеток слегка возрастал, тогда как после действия повышенной температуры наоборот происходило снижение этого показателя, свидетельствующее о повышении проницаемости клеточных мембран. Через 3 ч после стрессовой обработки ИМС полностью восстанавливался до контрольного уровня при обоих воздействиях (рис. 2).

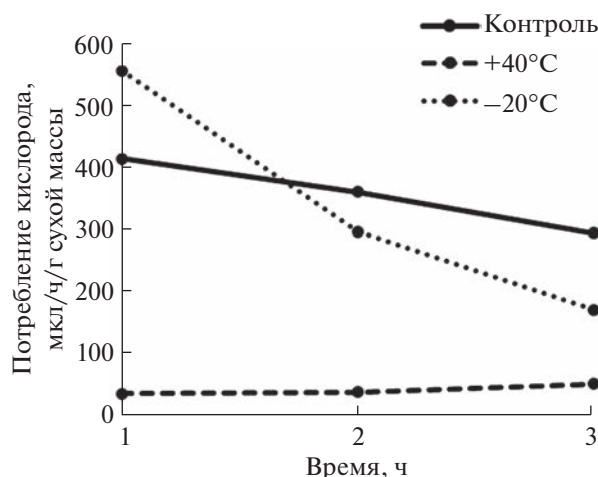


Рис. 1. Изменение потребления кислорода талломами лишайника *P. canina* в постстрессовый период, спустя 1, 2, 3 ч после стрессовой обработки неблагоприятными температурами (–20°C и +40°C), мкл/ч/г сухой массы. На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

Анализ стеринового и фосфолипидного состава лишайника P. canina при действии неблагоприятных температур

Анализ стеринового профиля показал, что для лишайника *P. canina* характерно наличие дегидроэргостерина, лихестерина, эргостерина, фунгистерина и эпистерина (рис. 3). Было обнаружено, что преобладающим стеринном *P. canina* является эргостерин, который был точно идентифицирован

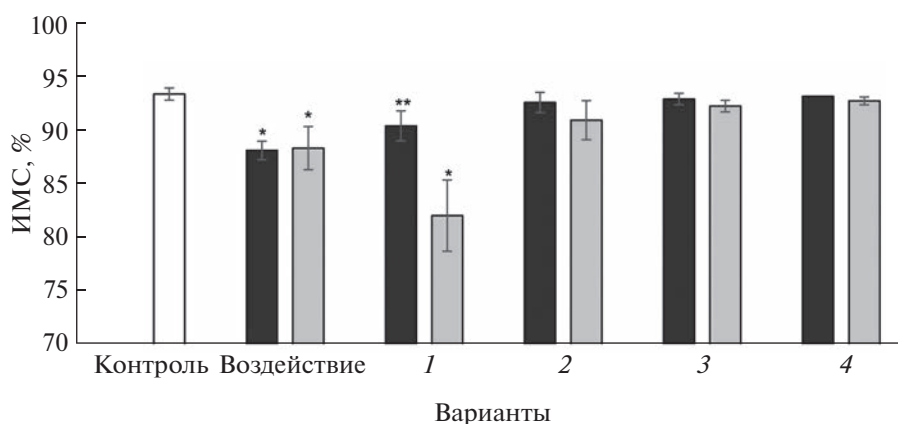


Рис. 2. Изменение ИМС в талломах лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур (-20°C и $+40^{\circ}\text{C}$) и в постстрессовый период после стрессовой обработки неблагоприятными температурами (варианты: **1** — через 1 ч после стрессовой обработки, **2** — через 3 ч после стрессовой обработки, **3** — через 5 ч после стрессовой обработки, **4** — через 24 ч после стрессовой обработки). Белым цветом обозначен контрольный вариант (ИМС гидратированного лишайника), светло-серым цветом окрашены столбцы значений ИМС лишайника при действии повышенной температуры $+40^{\circ}\text{C}$, темно-серым — при действии низкой отрицательной температуры -20°C . На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 5$. Достоверность различий определяли с помощью однократного дисперсионного анализа (ANOVA) при $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

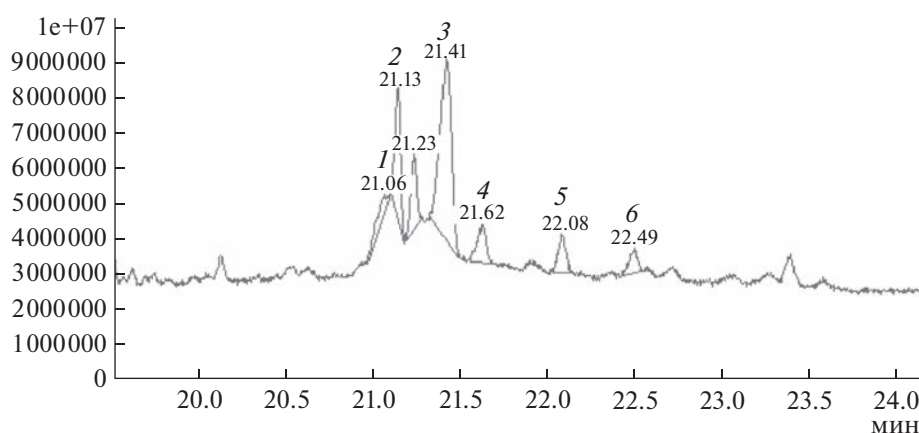


Рис. 3. ГХ-МС профиль стерина, выделенных из таллома лишайника *P. canina*. Приведен профиль стерина, идентифицированных в гидратированных талломах, не подвергавшихся действию неблагоприятных температур. Пики соединений пронумерованы, над каждым пиком указано точное время выхода соединений: **1** — дегидроэргостерин, **2** — лихестерин, **3** — эргостерин, **4** — фунгистерин, **5** — эпистерин, **6** — стерин не идентифицирован.

путем сопоставления его масс-спектра с масс-спектром стандарта эргостерина и по библиотеке масс-спектров NIST 17. Остальные стерин были идентифицированы по характерным фрагментарным ионам данных соединений, описанных в литературе [15, 16] (табл. 2). Соединение с временем выхода 22.49 мин (рис. 4, пик 6) идентифицировать не удалось, однако наличие в его масс-спектре ионов с m/z 414 и 399, характерных для стерина, позволило отнести его к этому классу. Известно, что ион m/z 414 образуется при фрагментации β -ситостерина [16].

О содержании обнаруженных в лишайнике стерина судили по площадям их пиков на ГХ-хроматограмме по отношению к общей сумме площадей пиков всех стерина (табл. 3). При дей-

ствии обеих неблагоприятных температур происходило заметное снижение доли эргостерина в стеринном пуле лишайника (табл. 3). Кроме того, наблюдались стресс-индуцированные изменения в содержании других стерина. Так, при холодной обработке наблюдалось увеличение относительного содержания дегидроэргостерина и эпистерина, происходило снижение доли лихестерина. Действие повышенной температуры вызывало увеличение доли эпистерина в талломе лишайника. Уровень более насыщенного фунгистерина оставался на контрольном уровне при всех воздействиях. Общий уровень стерина снижался при обоих воздействиях, но особенно значительно при низкотемпературной обработке (табл. 3).

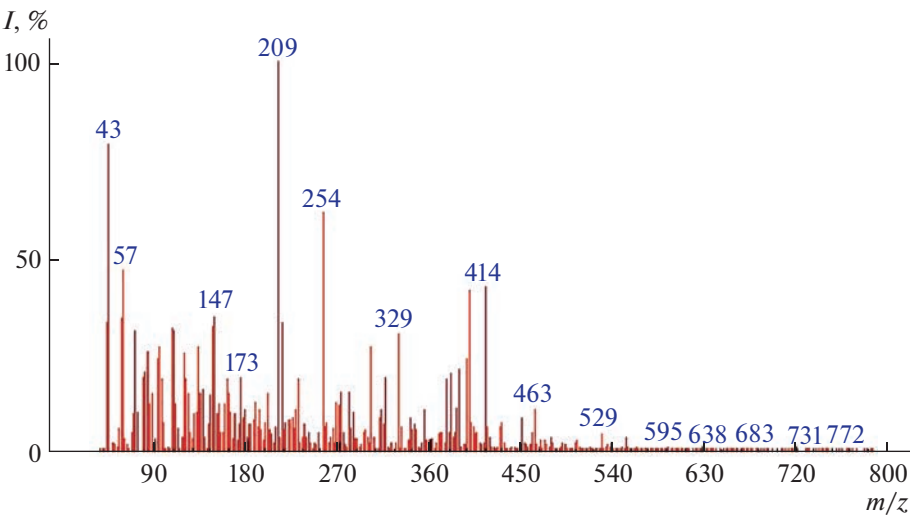


Рис. 4. Масс-спектр не идентифицированного соединения (пик 6 на рис.3 с временем выхода 22.49 мин).

Таблица 2. Основные фрагментарные ионы и их интенсивность в масс-спектрах стеринов лишайника *P. canina*.

Стерины	Время выхода, мин	Фрагментарные ионы (<i>m/z</i>) и их интенсивность (<i>I</i> , %)
Дегидроэргостерин	21.06	363 (69), 253 (41), 251 (99), 209 (97), 207 (32), 195 (29), 69 (36), 55 (53), 43 (86), 41 (33)
Лихестерин	21.13	396 (35), 364 (31), 363 (99), 253 (38), 211 (25), 157 (24), 143 (27), 69 (22), 55 (36), 43 (64)
Эргостерин	21.41	396 (52), 363 (99), 337 (34), 253 (36), 157 (37), 145 (39), 143 (50), 81 (37), 69 (78), 55 (65)
Фунгистерин	21.62	380 (41), 253 (46), 237 (99), 213 (44), 207 (33), 195 (37), 181 (34), 131 (43), 55 (47), 43 (84)
Эпистерин	22.08	314 (20), 281 (18), 272 (21), 271 (99), 105 (17), 94 (16), 79 (18), 69 (38), 55 (27), 41 (19)
Не идентифицирован	22.49	414 (43), 399 (41), 254 (61), 213 (33), 209 (99), 147 (34), 57 (47), 55 (34), 43 (79), 41 (33)

Таблица 3. Относительное содержание стеринов лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур (–20°C и +40°C)

Стерины	Относительное содержание, %		
	контроль	–20°C	+40°C
Дегидроэргостерин	7.7 ± 0.4	10.3 ± 0.7*	8.0 ± 0.2
Лихестерин	23.8 ± 1.0	17.2 ± 0.7**	22.4 ± 0.6
Эргостерин	61.0 ± 1.9	53.3 ± 0.9*	48.9 ± 1.0**
Фунгистерин	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.7	6.4 ± 0.4
Эпистерин	6.5 ± 0.0	11.3 ± 0.2***	9.0 ± 0.5**
Не идентифицирован	4.7 ± 0.4	6.0 ± 0.8	5.9 ± 0.1*
Общая сумма стеринов	100	55.7 ± 7.2**	86.5 ± 2.1**

Примечание. В таблице представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (*SE*) при *n* = 3. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при *P* < 0.05 (*); *P* < 0.01 (**); *P* < 0.001 (***).

Таблица 4. Изменение содержания фосфолипидов в талломах лишайника *P. canina* при действии неблагоприятных температур (–20°C и +40°C)

Фосфолипиды	Содержание, мг/г сухой массы		
	контроль	–20°C	+40°C
ЛФХ	0.36 ± 0.08	0.13 ± 0.02*	0.06 ± 0.01***
ФИ	0.74 ± 0.08	1.52 ± 0.09**	1.92 ± 0.05***
ФХ	5.35 ± 0.10	4.74 ± 0.04**	5.06 ± 0.07
ФЭ	3.12 ± 0.13	2.98 ± 0.05	2.79 ± 0.08

Примечание. В таблице представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (*SE*) при *n* = 3. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при *P* < 0.05 (*); *P* < 0.01 (**); *P* < 0.001 (***).

ВЭТСХ анализ стресс-индуцированных изменений фосфолипидного состава показал, что при температурной обработке основные фосфолипиды мембран (ФХ и ФЭ) остаются на контрольном уровне, содержание ФИ значительно увеличивается, а содержание ЛФХ заметно снижается (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В естественной среде обитания лишайники часто испытывают температурный стресс. Пельтигеровые лишайники (семейство Peltigeraceae Dumort.), произрастающие в областях умеренного климата и отличающиеся высокими темпами роста и активным редокс-метаболизмом [9], могут обладать повышенной чувствительностью к действию экстремальных температур. Эти факторы обусловили выбор лишайника *P. canina* в качестве объекта исследования. Фотобионтом лишайника является цианобактерия *Nostoc punctiforme*. *P. canina* растет в довольно тенистых местах, встречается на почве по склонам канав и на обочинах дорог, на корневых лапах и гниющих пнях. Вид распространен в Европе, Азии, Северной и Южной Америке, Африке, Австралии [17].

Значительная часть метаболически активного периода лишайников происходит при низкой интенсивности света или в полной темноте [18]. Необходимо учитывать и тот факт, что фотосинтетический партнер может составлять всего 5–10% биомассы лишайника [19]. В связи с этим дыхательная нагрузка на фотосинтетическую клетку может быть значительной у этих симбиотических организмов, а, следовательно, скорость дыхания оказывает большое влияние на прирост углерода и является важным показателем физиологического состояния лишайника. Многочисленными исследованиями показано, как факторы окружающей среды влияют на интенсивность дыхания у лишайников [20]. В наших экспериментах было показано, что при действии повышенной температуры наблюдается значительное подавление дыхания у талломов лишайника (рис. 1). Аналогичный эффект наблюдался в работе Smyth (1934)

при действии высокой температуры на лишайник *P. canina* [21]. Автор связывает ингибирование дыхания с повреждающим действием высокой температуры на компоненты дыхательной цепи. Обработка пониженной температурой не вызвала столь значительных изменений дыхательной активности лишайника в первые 2 ч, лишь к третьему часу происходило небольшое подавление дыхания (рис. 1).

Проницаемость мембран является одним из наиболее чувствительных параметров для оценки физиологической реакции лишайников на воздействие окружающей среды [22]. Так, показано, что тяжелые металлы могут повреждать биологические мембраны лишайников, вызывая утечку ионов [23, 24]. Снижение ИМС после выдерживания талломов при действии экстремальных температур в наших экспериментах свидетельствует о повреждении клеточных мембран (рис. 2).

Наблюдаемые физиологические изменения свидетельствуют о стрессовом состоянии лишайника после термической обработки. По-видимому, *P. canina* более чувствительна к действию повышенных температур, так как даже через 3 ч после воздействия дыхание остается подавленным. Однако восстановление ИМС до контрольного уровня через 3 ч после действия обеих экстремальных температур может свидетельствовать об адаптивных процессах, происходящих в мембранах клеток талломов лишайника.

В настоящее время доминирующей гипотезой о сенсоре температурных колебаний в растениях является гипотеза об изменении текучести мембраны, которая, в частности, обсуждается в обзоре Ф. Р. Гималова [25]. Предполагают, что плазматическая мембрана действует как первичный сенсор температурных колебаний вследствие динамических изменений ее физических характеристик [26]. Показано, что температурный сигнал воспринимается растением через изменение текучести мембраны, вызывающее реорганизацию цитоскелета и поток ионов кальция в цитоплазму, активацию кальций-зависимых протеинкиназ и

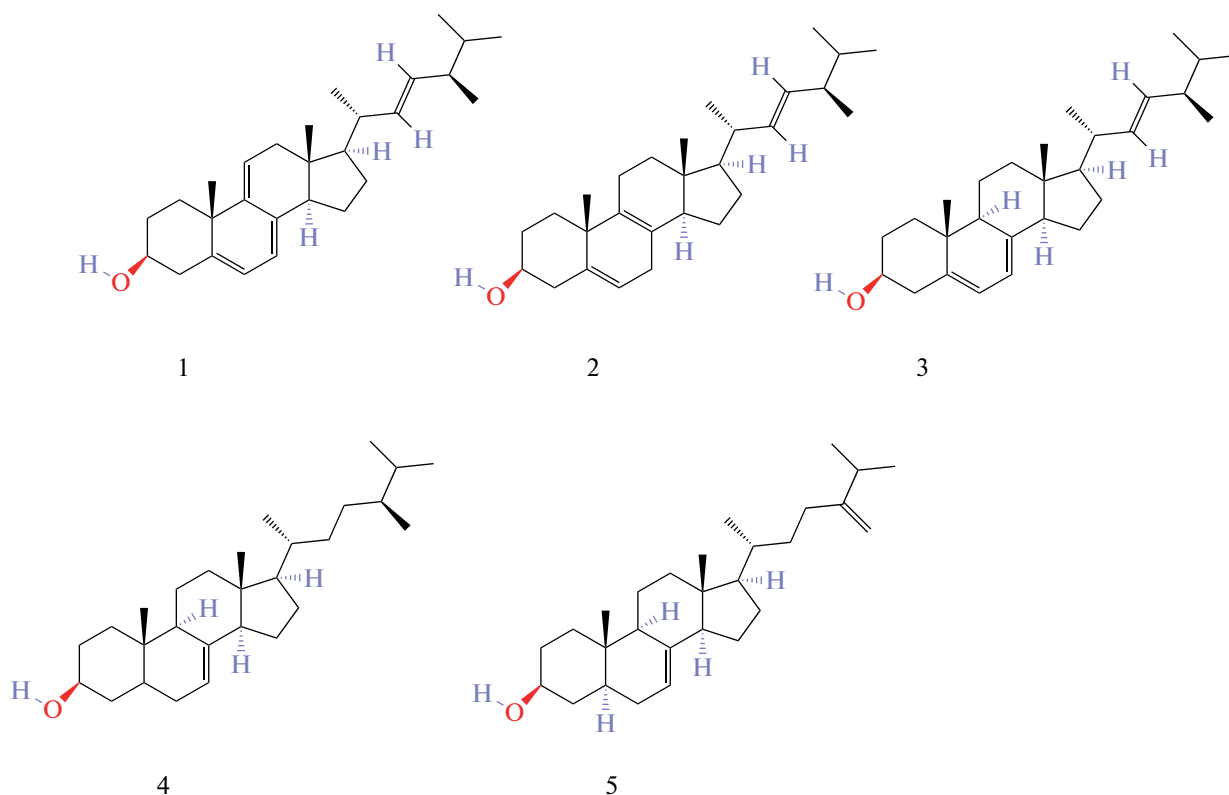


Рис. 5. Структурные формулы стеринов лишайника *P. canina*. 1 — дегидроэргостерин, 2 — лихестерин, 3 — эргостерин, 4 — фунгистерин, 5 — эпистерин.

МАР-киназ [27]. Известно, что понижение температуры уменьшает, а повышение температуры, наоборот, увеличивает текучесть мембран [28, 29], то есть температура как физический параметр оказывает термодинамический эффект на биологические молекулы (белки, ДНК) и надмолекулярные структуры (мембраны, хромосомы).

Известно, что в основе регуляции текучести и проницаемости биологических мембран лежит изменение соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [30]. В экспериментах на свободноживущей цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 продемонстрировано, что при понижении температуры происходит индукция активности генов десатураз и вследствие этого увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот в составе мембран и, соответственно, повышается их текучесть [31]. Можно полагать, что лишайники как фотосинтезирующие организмы могут проявлять схожую реакцию на изменение температуры.

Другим важным компонентом, влияющим на текучесть клеточных мембран, являются молекулы стеринов, которые взаимодействуют с головками фосфолипидов, частично иммобилизуя проксимальную часть углеводородной цепи [32]. Стабилизирующая способность молекулярных видов стеринов может различаться в зависимости от

особенностей их химической структуры, в частности, от количества двойных связей, этильных и метильных групп в структуре молекулы стерина [33]. Как следствие, соотношение молекулярных видов стеринов в мембране может влиять на ее текучесть и проницаемость.

Анализ стеринового профиля *P. canina* показал, что для этого лишайника характерно наличие дегидроэргостерина, лихестерина, эргостерина, фунгистерина и эпистерина (рис. 3). Таким образом, лишайник *P. canina* обладает достаточно богатым стериновым составом, если учесть, что у растений обычно присутствует три основных стерина, а у животных и грибов — всего лишь один основной стерин. Необходимо отметить, что все стерины *P. canina* являются метилстеринами, в отличие от растений, где преобладающими стеринами являются более гидрофобные этилстерины — β -ситостерин и стигмастерин. В целом, можно сказать, что весь пул стеринов лишайника является более ненасыщенным, чем у растений, так как у большинства стеринов имеются две и более двойных связей (рис. 5). Преобладающим стеринотипом лишайника *P. canina* является эргостерин, характерный для грибов, что неудивительно, поскольку микобионт составляет до 95% биомассы лишайника [1]. Известно, что эргостерин обладает

большой реакционной способностью благодаря наличию в кольце системы сопряженных двойных связей. В грибах эргостерин является главным компонентом секреторных везикул и играет чрезвычайно важную роль в дыхании и окислительном фосфорилировании в митохондриях, что позволяет называть этот стерин метаболическим маркером [11].

В работе [11] продемонстрирована прямая корреляция между изменением содержания эргостерина и интенсивностью дыхания лишайника. В наших экспериментах мы также отчасти наблюдали корреляцию между дыхательной активностью и уровнем эргостерина: при действии обеих неблагоприятных температур происходило заметное снижение доли эргостерина в стериновом пуле лишайника (табл. 3), что сопровождалось снижением дыхательной активности таллома, особенно при действии повышенной температуры. Помимо уменьшения доли эргостерина, происходили стресс-индуцированные изменения в относительном содержании и других стеринов лишайника. При холодовой обработке наблюдалось увеличение относительного содержания деметилированных стеринов дегидроэргостерина и эпистерина, а также снижение доли лихестерина (табл. 3). Необходимо отметить, что лихестерин является уникальным стеринем, который можно обнаружить только в лишайниках [34]. Действие повышенной температуры также вызывало увеличение доли эпистерина в талломе лишайника (табл. 3). Уровень более насыщенного фунгистерина оставался на контрольном уровне при всех воздействиях. Общий уровень стеринов снижался при обоих воздействиях, но особенно значительно при низкотемпературной обработке (табл. 3), что может свидетельствовать об увеличении текучести клеточных мембран лишайника при действии экстремальных температур, что согласуется со снижением стабильности мембран (рис. 2).

Можно полагать, что в механизмы стресс-индуцированных изменений стеринового состава вовлечены фосфолипиды. Анализ фосфолипидного состава лишайника *P. canina* показал, что в условиях температурного стресса содержание основных фосфолипидов лишайника ФХ и ФЭ не изменяется, однако наблюдаются значительные изменения в содержании ФИ и ЛФХ (табл. 4). Известно, что ФИ является минорным фосфолипидом клеточных мембран, его содержание составляет от 2 до 8% от всех ФЛ, но его функциональная роль велика, особенно в процессах сигналинга [35]. В ряде работ показано существенное (в 1.5–2.5 раза) увеличение содержания этих фосфолипидов у устойчивых к стрессовому воздействию растений [36]. ФИ участвует в регуляции содержания внутриклеточного кальция, и повышение количества ФИ может быть связано с адаптационными процессами в клетках [37]. Кроме того, обнаружено,

что ФИ являются регуляторами неvesикулярного транспорта эргостерина у дрожжей, и у ФИ-мутантов транспорт стеринов замедлен [38]. Эти данные вполне согласуются с нашими данными о снижении доли эргостерина в *P. canina* при действии неблагоприятных температур, однако механизмы взаимосвязи содержания эргостерина и ФИ в лишайнике остаются неясными. В растениях лизофосфолипиды, в частности ЛФХ, образуются в ответ на стрессовые воздействия в результате активации фосфолипаз, в том числе фосфолипазы А₂ [39]. Недавние исследования свидетельствуют о роли лизофосфолипидов в термотолерантности в различных организмах [40]. Наблюдаемое в наших экспериментах заметное снижение уровня ЛФХ у лишайника в условиях температурного стресса (табл. 4) является довольно необычной стрессовой реакцией и требует дальнейшего детального изучения.

На основании полученных данных можно заключить, что лишайник *P. canina* проявляет большую чувствительность к повышению температуры, что выражается в значительном подавлении дыхательной активности и снижении стабильности мембран. Однако стериновый ответ более ярко выражен при действии на лишайник низкой отрицательной температуры, несмотря на более сдержанную физиологическую реакцию. Можно предположить, что при действии отрицательной температуры происходит замедление синтеза эргостерина и накопление его предшественников дегидроэргостерина и эпистерина. У дегидроэргостерина имеются 4 двойные связи, то есть он является самым ненасыщенным из вышеперечисленных стеринов и, по всей видимости, вносит свой вклад в увеличение проницаемости мембран таллома и, соответственно, увеличение их текучести. Возможно, стресс-индуцированные изменения стеринового профиля лишайника при холодовой обработке создают оптимальный баланс стеринов в мембранах, который способствует разворачиванию успешной стратегии, ведущей к адаптации лишайника к действию стрессора.

Таким образом, можно полагать, что разнообразный стериновый состав позволяет лишайнику тонко регулировать текучесть мембран за счет создания необходимого соотношения более насыщенных и менее насыщенных стеринов в мембране.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания Федерального исследовательского центра Казанского научного центра Российской академии наук (оценка дыхательной активности и ИМС), а также при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда <https://rscf.ru/project/22-14-00362> (рук. Ю.Н. Валитова).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дьяков Ю.Т. Ботаника. Курс альгологии и микологии. Москва: Изд-во МГУ, 2007. 559 с.
2. Armstrong R.A. Adaptation of lichens to extreme conditions // Plant Adaptation Strategies Changing Environment / Eds Shukla V., Kumar S., Kumar N. Springer. 2017. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6744-0_1
3. Stocker-Wörgötter E. Stress and developmental strategies of lichens // Symbioses and Stress. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology / Eds Seckbach J., Grube M. Springer, Dordrecht. 2010. V. 17. P. 525.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0_27
4. Stanton D.E., Ormond A., Koch N.M., Colesie C. Lichen ecophysiology in a changing climate // Am. J. Bot. 2023. V. 110. E16131.
<https://doi.org/10.1002/ajb2.16131>
5. Chen K., Wei J.-C. Heat tolerance of the mycobionts and phycobionts from three desert lichens // Mycosystema. 2015. V. 34. P. 1007.
6. Калугина Ю.В., Никитина И.И. Кробиология. Киев: Наукова думка, 1994. 432 с.
7. Порядина Л.Н., Прокопьев И.А., Конорева Л.А., Чесноков С.В., Слепцов И.В., Филиппова Г.В., Шашурин М.М. Адаптационные биохимические механизмы, обеспечивающие устойчивость лишайников к экстремальным условиям среды обитания // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2018. Т. 26. С. 109.
<https://doi.org/10.31242/2618-9712-2018-26-4-109-117>
8. Вайнштейн Е.А. Некоторые вопросы физиологии лишайников. I. Дыхание // Ботанический журнал. 1972. Т. 7. С. 832.
9. Beckett R.P., Minibayeva F.V., Vylegzhanina N.N., Tolpysheva T. High rates of extracellular superoxide production by lichens in the suborder *Peltigerineae* correlate with indices of high metabolic activity // Plant, Cell Environ. 2003. V. 41. P. 1827.
10. Семихатова О.А., Чулановская М.В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. Москва: Наука, 1965. 168 с.
11. Sundberg B., Ekblad A., Näsholm T., Palmqvist K. Lichen respiration in relation to active time, temperature, nitrogen and ergosterol concentrations // Funct. Ecol. 2002. V. 13. P. 119.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00295.x>
12. Грищенко Н.Н., Лукаткин А.С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3.
13. Bligh E.C., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911.
14. ОФС 1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1.
15. Safe S., Safe L.M., Maass W.S.G. Sterols of three lichen species: *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria scrobiculata* and *Usnea longissima* // Phytochemistry. 1975. V. 14. P. 1821.
16. Solberg Y. Chemical constituents of the lichens *Cetraria delisei*, *Lobaria pulmonaria*, *Stereocaulon tomentosum* and *Usnea hirta* // J. Hattori Bot. Lab. 1987. V. 63. P. 357.
17. Горбач Н.В. Лишайники Белоруссии. Определитель. Минск: Наука и техника, 1973. 77 с.
18. Sundberg B., Palmqvist K., Esseen P.-A., Renhorn K.-E. Growth and vitality of epiphytic lichens. II. Modelling of carbon gain using field and laboratory data // Oecologia. 1997. V. 13. P. 10.
19. Ahmadjian V. The lichen symbiosis. Chichester: John Wiley & Sons. New York, 1993. 250 p.
20. Nash T.H. Photosynthesis, respiration, productivity and growth. Lichen Biology. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 88 p.
21. Smyth E.S. A Contribution to the physiology and ecology of *Peltigera canina* and *P. polydactyla* // Ann. Bot. 1934. V. 48. P. 781.
22. Mulgrew A., Williams P. Biomonitoring of air quality using plants. Air Hygiene Report 10. London: Kings College, 2000. 171 p.
23. Garty J., Tomer S., Levin T., Lehr H. Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel // Environ. Res. 2003. V. 91. P. 186.
[https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(02\)00057-9](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(02)00057-9)
24. Marques A.P., Maria C.F., Hubert T.W., Steinebach O.M., Verburg T., De Goeij J.J. Cell-membrane damage and element leaching in transplanted *Parmelia sulcata* lichen related to ambient SO₂, temperature, and precipitation // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. P. 2624.
<https://doi.org/10.1021/es0498888>
25. Гималов Ф.Р. Восприятие растениями холодового сигнала, или как устроен растительный “термометр” // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. С. 19.
<https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-0-2-19-24>
26. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // Photosynth. Res. 2013. V. 116. P. 489.
27. Sangwan V., Orvar B.J., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways // The Plant Journal. 2002. V. 31. P. 629.
28. Saidi Y., Peter M., Finka A., Cicekli C., Vigh L., Goloubinoff P. Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca²⁺-dependent heat shock response // Plant Signaling behav. 2010. V. 5. P. 1530.
29. Rawat N., Singla-Pareek S.L., Pareek A. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same // Physiol. Plant. 2021. V. 171. P. 653.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13217>
30. Renne M.F., IPM de Kroon A. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // FEBS Lett. 2018. V. 8. P. 1330.
31. Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis* // EMBO J. 2000. V. 19. P. 1327.

32. Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Роль стерина в морфогенетических процессах и диморфизме грибов // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 5.
33. Попов А.М. Comparative study of effects of various sterols and triterpenoids on permeability of model lipid membranes // J. Evol. Biochem. Physiol. 2003. V. 39. P. 314.
34. Дембицкий В.М., Толстиков Г.А. Природные галогенированные органические соединения. Новосибирск: Изд-во СО РАН, Гео, 2003. 366 с.
35. Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction // Nature. 1984. V. 312. P. 315.
36. Xue H.-W., Chen X., Me Y. Function and regulation of phospholipid signaling in plants // Biochem. J. 2009. V. 421. P. 145.
37. Su K., Bremer D.J., Jeannotte R. Membrane lipid composition and heat tolerance in cool-season turfgrasses, including a hybrid bluegrass // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2009. V. 134. P. 511.
38. Ravchaudhuri S., Im Y.J., Hurley J.H., Prinz W.A. Non-vesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides // J. Cell Biol. 2006. V. 173. P. 107.
39. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
40. Fabri J., de Sa N.P., Malavazi I., Del Poeta M. The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation // Prog Lipid Res. 2020. V. 80. P. e101063
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101063>

УДК 581.1, 582.32

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ПОБЕГАХ МХА *Hylocomium splendens* Hedw. В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

© 2023 г. А. Г. Ренкова^{a, *}, В. Р. Хабибрахманова^{a, b}, О. П. Гурьянов^a, Е. И. Галеева^a,
А. Б. Мазина^a, Ф. В. Минибаева^a

^aКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Казанский национальный исследовательский технологический университет”, Казань, Россия

*e-mail: renkova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Способность растений адаптироваться к неблагоприятным условиям существования является необходимым условием выживания растений, сохранения генотипа и поддержания разнообразия флоры. Перспективным подходом для решения проблемы повышения устойчивости растений является изучение механизмов стрессовой устойчивости “экстремофилов”, в том числе мхов — высших несосудистых растений. Относительная простота анатомического строения и способность к выживанию в неблагоприятных условиях среды делают эти эволюционно-древние растения идеальными моделями для изучения механизмов адаптации. Известно, что функциональная активность фотосинтетического аппарата способна динамично изменяться при действии стрессовых факторов. В настоящей работе было проведено исследование стресс-индуцированных изменений содержания каротиноидов в лесном мхе гиелокомиум блестящий (*Hylocomium splendens* Hedw.) в условиях температурного стресса. Нами были идентифицированы основные каротиноиды мха *H. splendens*. Установлено, что относительное содержание лютеина, β-каротина и зеаксантина возрастало при действии отрицательной и повышенной температур, тогда как общее содержание каротиноидов при температурном стрессе снижалось. Показано, что 1 ч воздействия неблагоприятных температур приводил к достоверному снижению нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*, причем более сильные изменения наблюдались при воздействии отрицательной температуры. Анализ уровня транскриптов *HsLUT1*, одного из ключевых генов биосинтеза лютеина, при температурном стрессе показал его достоверное увеличение в 4–5 раз. Таким образом, полученные нами данные позволили выявить, что изменения экспрессии гена биосинтеза каротиноидов сопровождаются изменениями их содержания при температурном стрессе. Полученные данные расширяют наше знание о механизмах устойчивости у мохообразных и будут способствовать пониманию эволюционных изменений стрессовой устойчивости высших растений.

Ключевые слова: *Hylocomium splendens*, абиотический стресс, каротиноиды, пигменты, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330323601000, **EDN:** BELXXA

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды — это широко распространенные группы изопреноидных пигментов, образующиеся в результате конденсации восьми изопреноидных единиц. По наличию заместителей их подразделяют на две группы: простые углеводородные соединения — каротины и их окисленные

производные — ксантофиллы, содержащие окси-, эпокси- и кетогруппы. Они синтезируются во всех фотосинтезирующих организмах, а также в некоторых нефотосинтезирующих бактериях и грибах. Согласно немногим данным, папоротники и мхи содержат, в основном, те же самые каротиноиды, что и высшие растения [1].

Биологическая активность каротиноидов определяется их высокой антиоксидантной активностью [2]. Каротиноиды являются активными поглотителями синглетного кислорода в растениях, что обуславливает их важную биологическую функцию — защиту клеточных компонентов, таких как

Сокращения: Био — виолаксантин; ВКЦ — виолаксантиновый цикл; ДФПГ — 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; Зеа — зеаксантин; α-кар — α-каротин; β-кар — β-каротин; Лют — лютеин; Нео — неоксантин; ССК — светособирающие комплексы; ФСІ, ФСІІ — фотосистема I и II; NPQ — нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла.

хлорофиллы, липиды, белки, ДНК и др., от окислительного повреждения. Каротиноиды синтезируются в тесной координации с хлорофиллами, и их состав консервативен у высших растений [3]. В зеленых тканях растений каротиноиды участвуют в механизмах фотозащиты и стабилизации фотосинтетического аппарата [4]. Известно, что ксантофилловый цикл, или виолаксантиновый цикл (ВКЦ), выполняет функцию защиты фотосинтетического аппарата от избытка энергии при повышенной инсоляции и повреждающего действия синглетного кислорода. Цикл включает в себя ферментативные взаимопревращения между виолаксантином (Вио) и зеаксантином (Зеа) (промежуточный продукт — антероксантин) [5, 6]. При этом главную фотопротекторную функцию выполняет Зеа, на который переносится энергия возбуждения хлорофилла и далее преобразуется в тепловую. Этот механизм известен как нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (NPQ) [7]. У каротиноидов выделяют и другие биологические функции, их накопление во многих цветках и плодах обеспечивает привлечение опылителей, способствует рассеиванию семян птицами. Наконец, каротиноиды служат предшественниками для синтеза растительных гормонов — абсцизовой кислоты (АБК) и стриголактонов, а также других апокаротиноидов, которые участвуют во многих процессах развития и стрессовых реакциях [8, 9]. В связи с важностью каротиноидов для физиологии, развития, экологии и эволюции растений, изучение их метаболизма и функций представляет значительный интерес.

Путь биосинтеза каротиноидов широко изучен на высших растениях, и почти все вовлеченные гены выделены и охарактеризованы [10, 11]. У высших растений некоторые гены биосинтеза каротиноидов являются избыточными, что позволяет предположить, что эти гены были дублированы и функционально разошлись в ходе эволюции растений.

В отличие от высших сосудистых растений, в литературе имеется мало информации о составе каротиноидов и их роли в стрессовой устойчивости у мохообразных, которые считаются эволюционно ранними наземными несосудистыми растениями. Для понимания эволюции биосинтеза каротиноидов в растениях изучение данного процесса у мохообразных является весьма актуальной задачей. Анализ литературы выявил наличие лишь единичных работ по исследованию состава каротиноидов и идентификации генов их биосинтеза у мохообразных, в частности, *Physcomitrium patens* и *Marchantia polymorpha* [12, 13]. Как и высшие сосудистые растения, побеги мхов содержат в качестве основных каротиноидов лютеин (Лют) и β -каротин (β -кар) [12]. Ранее нами был проведен анализ антиоксидантной активности органических экстрактов нескольких видов мхов —

Dicranum scoparium, *Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens*, *Sphagnum magellanicum*. Было показано, что среди экстрактивных веществ именно каротиноиды обладают наибольшей антирадикальной активностью в отношении 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). При этом самое высокое количество каротиноидов содержалось в экстракте мха *H. splendens* (неопубликованные данные). Несмотря на широкую распространенность *H. splendens* в лесах Северного полушария и горных местностях, информация о стрессовой устойчивости данного бриофита отсутствует. В частности, остаются практически неизученными изменения каротиноидного состава этого мха в стрессовых условиях. На основании вышесказанного, исследование изменения профиля каротиноидов и генов их биосинтеза малоизученного лесного мха *H. splendens* в условиях температурного стресса является актуальным и может дать недостающую информацию о роли каротиноидов в стрессовых ответах у мохообразных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования был использован мох *Hylocomium splendens* Hedw., собранный в лесах Айшинского лесничества Республики Татарстан (55°53' 21.3 с.ш 48°38' 14.3 в.д) в мае 2022 г. После предварительной очистки сухие побеги мха хранились в контролируемых прохладных условиях в темноте. Основываясь на полученных ранее результатах по оценке фотосинтетической активности разных ярусов мха *H. splendens* на воздействие неблагоприятных температур [14], для анализа нами была использована верхняя часть побега (первые два яруса), в которой метаболические процессы идут интенсивнее, в т. ч. ответные реакции на стрессовые воздействия.

Стрессовая обработка. Побеги мха *H. splendens* гидратировали дистиллированной водой в течение 24 ч при температуре 10°C в условиях темноты. Далее гидратированные образцы мха инкубировали в течение 1 ч в климатической камере с контролируемой отрицательной (–20°C) и повышенной (30°C) температурами. Для оценки стрессового ответа мха материал отбирали сразу же после воздействия неблагоприятных температур, а также через 1, 3, 5, 24 ч выдерживания мха при комнатной температуре после стрессового воздействия. Оводненность образцов мха определяли в каждой временной точке высушиванием до постоянного веса на анализаторе влажности АВГ-60 (“Госметр”, Россия).

Анализ профиля каротиноидов. Исследование состава и содержания каротиноидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LicArt 62 (“Лабконцепт”, Россия). Пробоподготовку и раз-

деление пигментов осуществляли согласно [15] с небольшими модификациями. Образец мха растирали в жидком азоте, из полученного порошка отбирали навеску массой 0.1 г и переносили в эпепендорф, добавляли 0.5 мл ацетона. Для интенсификации извлечения каротиноидов смесь в эпепендорфе подвергали обработке 5 мин ультразвуком (ванна ультразвуковая “Сапфир”, Россия), далее центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. Стадии экстрагирования повторяли до максимально полного извлечения пигментов из навески мха (5–6 стадий). Полученные экстракты объединяли и высушивали на ротационном испарителе RV 8 (“IKA”, Германия). Для ВЭЖХ использовали: элюент А – ацетонитрил : метанол : вода (75 : 12 : 4), элюент В – метанол : этилацетат (68 : 32). Высушенные экстракты пигментов растворяли в 400 мкл элюента А, центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин, 20 мкл супернатанта отбирали и хроматографировали на колонке с обращенной фазой Inertsil ODS-3, 3 мкм, 4.6 × 100 мм (“GL Sciences”, Япония). Соединения хроматографировали при градиентном режиме со следующей последовательностью элюентов: 0 мин А – 100%; 0–15 мин А – 0% и В – 100%; 15–40 мин В – 100%. Скорость потока элюента 0.5 мл/мин. Температура хроматографирования составляла 25°C. Каротиноиды детектировали с помощью диодно-матричного детектора DAD-62 (“Лабкон-цепт”, Россия) при 440 нм. Управление работой хроматографа, прием и обработку полученных данных проводили с помощью специализированной компьютерной программы “LicArt WSV”.

Идентификацию каротиноидов в экстрактах мха осуществляли по электронным спектрам в области 300–700 нм [16, 17] и путем сопоставления с временами выхода стандартов каротиноидов – β-каротина и лютеина (“Sigma-Aldrich”, США, степень чистоты не менее 95%), хроматографируемых при аналогичных условиях.

Анализ относительного уровня экспрессии генов. Анализ экспрессии гена каротин ε-монооксигеназы (*HsLUT1*) осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК *H. splendens* выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия), согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”, США), целостность проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) проводили на термоциклере C1000 Touch™ (“Bio-Rad”, США) с набором MMLV RT (“Евроген”, Россия) в реакционном объеме 25 мкл по стандартному протоколу производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием системы CFX Connect Real-Time PCR (“Bio-Rad”, США). Оценку уровня экспрессии гена *HsLUT1* осуществляли относительно референсных генов:

18S рРНК (*18S*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH2*), α-тубулина 1 (*TUB1*), α-тубулина 2 (*TUB2*) [18].

Анализ фотосинтетических параметров. Модулированную флуоресценцию хлорофилла *a* измеряли на базе системы РАМ (от англ. Pulse Amplitude Modulation) при помощи флуориметра FMS1+ (“Hansatech Instruments”, Великобритания) со стандартной листовой клипсой с использованием красного светодиода. После периода темновой адаптации продолжительностью не менее 10 мин производили вспышку насыщающего света в 85 ед. продолжительностью 0.7 с (максимальная интенсивность до 13000 мкмоль фотонов/м² с) и измеряли максимальную флуоресценцию (F_M). После снижения уровня флуоресценции до исходного темнового значения (F_0) включали непрерывный действующий свет с плотностью потока 105 мкмоль фотонов/м² с, и через 40 с включали второй насыщающий импульс для определения максимального выхода флуоресценции (F_M') в адаптированном к свету состоянии. По полученным значениям рассчитывали NPQ по формуле:

$$NPQ = (F_M - F_M') / F_M'.$$

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3–6 биологических повторностях и 3–14 аналитических повторностях. Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений со стандартными ошибками (SE). Все экспериментальные данные имеют нормальное распределение признака. Для сравнения их средних арифметических значений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с оценкой попарных различий с помощью критериев Тьюки, Бонферрони. Различия в экспрессии генов оценивали по нормализованной экспрессии ($\Delta\Delta C_q$) в Bio-Rad CFX Maestro, достоверность анализировали с использованием ANOVA и по тесту на нормальность по Шапиро–Уилку.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав и динамика изменений содержания каротиноидов в побегах мха в условиях температурного стресса

В настоящей работе проведено исчерпывающее экстрагирование и анализ состава и содержания каротиноидов из побегов мха *H. splendens*. Установлено, что в составе каротиноидов преобладают ксантофиллы (80–85%), среди которых основную долю занимает Лют (в среднем 46–50%) (табл. 1). Стоит отметить, что из ксантофиллов, входящих в ВКЦ, преобладает Вио, содержание которого почти в 4 раза выше содержания Зеа. Антероксантин, являющийся промежуточным продуктом взаимопревращений Вио и Зеа в

Таблица 1. Состав и динамика изменения относительного содержания каротиноидов в побегах мха *H. splendens* в условиях температурного стресса.

Каротиноиды	Относительное содержание, % (расчет по площади пиков)					
	контроль	стрессовое воздействие	постстрессовый период после стрессового воздействия			
			1 ч	3 ч	5 ч	24 ч
–20°C						
н.и. 1	3.17 ± 0.01	2.46 ± 0.04***	3.55 ± 0.16	1.69 ± 0.10***	1.99 ± 0.22**	1.74 ± 0.04***
Нео	5.33 ± 0.01	6.30 ± 0.11***	5.38 ± 0.23	4.74 ± 0.08**	4.67 ± 0.09**	5.14 ± 0.12
Вио	12.4 ± 0.01	3.34 ± 0.06***	5.94 ± 0.16***	5.08 ± 0.37***	4.81 ± 0.11***	2.97 ± 0.20***
Лют	50.5 ± 0.02	52.5 ± 0.78	53.6 ± 0.07***	51.8 ± 0.13***	51.9 ± 0.45*	54.5 ± 0.08***
Зеа	2.78 ± 0.08	5.25 ± 0.09***	5.51 ± 0.13***	4.76 ± 0.11***	4.91 ± 0.1***	5.16 ± 0.39**
н.и. 2	2.85 ± 0.04	4.09 ± 0.03***	4.53 ± 0.01***	4.15 ± 0.01***	4.14 ± 0.02***	4.33 ± 0.17***
н.и. 3	3.25 ± 0.02	3.94 ± 0.07***	4.03 ± 0.02***	4.16 ± 0.00***	4.08 ± 0.01***	4.20 ± 0.02***
α-кар	1.16 ± 0.01	1.27 ± 0.02**	1.58 ± 0.02***	1.10 ± 0.04	1.00 ± 0.03**	0.94 ± 0.01***
β-кар	18.3 ± 0.02	20.6 ± 0.37**	15.9 ± 0.40**	22.5 ± 0.46***	22.9 ± 0.06***	20.9 ± 0.20***
Общее содержание	100	76.0 ± 0.1***	78.9 ± 0.7***	51.2 ± 0.5***	42.2 ± 2.5***	44.9 ± 1.1***
30°C						
н.и. 1	6.96 ± 0.02	3.73 ± 0.07***	4.48 ± 0.11***	3.47 ± 0.31***	3.21 ± 0.08***	4.86 ± 0.07***
Нео	6.03 ± 0.36	5.22 ± 0.18	5.23 ± 0.01	5.16 ± 0.34	5.04 ± 0.04*	5.08 ± 0.09*
Вио	11.7 ± 0.09	6.16 ± 0.25***	6.34 ± 0.51***	5.67 ± 0.78***	5.40 ± 0.10***	4.45 ± 0.66***
Лют	46.4 ± 0.10	52.2 ± 0.85**	50.9 ± 1.21*	50.5 ± 0.82**	51.1 ± 0.43***	51.3 ± 0.98**
Зеа	3.93 ± 0.36	5.94 ± 0.27	5.38 ± 0.03	5.61 ± 0.07	5.63 ± 0.20	7.24 ± 0.05*
н.и. 2	3.72 ± 0.09	4.27 ± 0.04**	4.27 ± 0.06**	4.25 ± 0.01**	4.24 ± 0.05**	4.33 ± 0.01**
н.и. 3	3.27 ± 0.02	3.60 ± 0.03***	3.58 ± 0.05**	3.70 ± 0.08**	3.89 ± 0.01***	3.32 ± 0.18
α-кар	1.38 ± 0.04	1.11 ± 0.04**	1.30 ± 0.01	1.29 ± 0.04	1.23 ± 0.09	1.30 ± 0.10
β-кар	14.6 ± 0.57	17.8 ± 0.35**	18.5 ± 0.92*	20.3 ± 0.04***	20.2 ± 0.05***	17.9 ± 0.27**
Общее содержание	100	58.3 ± 1.1***	59.2 ± 1.2***	32.5 ± 1.2***	46.2 ± 0.1***	36.8 ± 1.7***

Примечание. Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; α-кар – α-каротин; β-кар – β-каротин; н. и. – не идентифицированный каротиноид. В таблице представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 3$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA при $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***).

ВКЦ, не детектировался с помощью ВЭЖХ, что, вероятно, свидетельствует об очень низком содержании этого ксантофилла в общем пуле каротиноидов мха *H. splendens*. Среди каротинов наибольшую долю занимает β-кар (15–18%). Три каротиноида, обнаруженных в экстракте мха, идентифицировать не удалось. При этом два из них (н.и. 2 и н.и. 3) по времени выхода и максимумам поглощения на электронных спектрах [16, 17] могут быть отнесены к α-криптоксантину и β-криптоксантину, соответственно. Содержание этих каротинов в побегах мха сопоставимо (табл. 1).

При воздействии неблагоприятных температур состав каротиноидов мха *H. splendens* сохранялся, однако их суммарное количество снижалось в среднем на 25–40% (табл. 1). Среди каротиноидов достоверно снижалась доля Вио, в среднем в 4 и 2 раза при воздействии отрицательной (–20°C) и повышенной (30°C) температуры, соответственно.

В условиях температурного стресса увеличивалось содержание Зеа и β-кар примерно на 2% и 3%, соответственно. Содержание Лют достоверно увеличивалось только при воздействии повышенной (30°C) температуры.

Установлено, что через 1 ч после выдерживания при комнатной температуре в побегах мха, подвергнутых воздействию отрицательной (–20°C) температуры, наблюдается падение доли β-кар в 1.3 раза, но увеличивается в 1.8 раза содержание Вио. В последующий постстрессовый период в течение 24 ч общее содержание каротиноидов в побегах мха *H. splendens* падало почти в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 1). При этом уже через 3 ч восстановления побегов мха после температурного стресса содержание β-кар возрастало примерно на 6.5% по сравнению с побегами, подвергнутыми холодовой обработке, и на 4% по сравнению с контролем. Содержание Лют в побе-

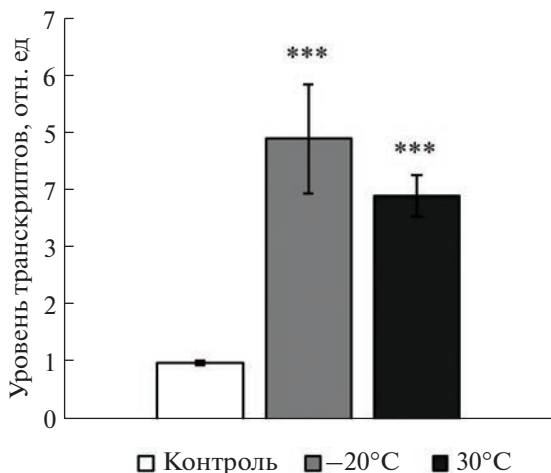


Рис. 1. Уровень транскриптов гена *HsLUT1* в *H. splendens* при действии низкой отрицательной и положительной температур. Уровень транскриптов контрольных вариантов принят за единицу. Три звездочки представляют значительную разницу при $P \leq 0.001$.

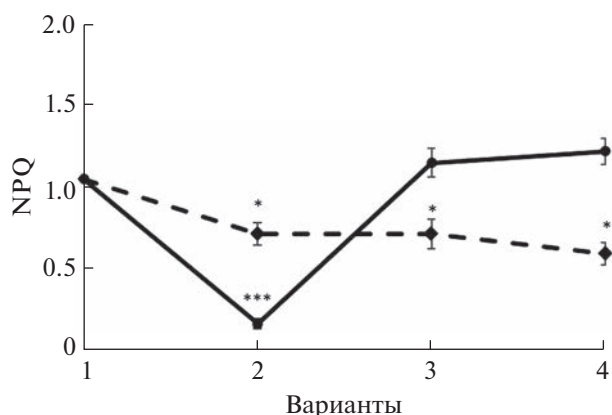


Рис. 2. Нефотохимическое тушение (NPQ) в побегах мха *H. splendens* при действии неблагоприятных температур: -20°C (сплошная линия) и 30°C (штриховая линия). 1 — контроль; 2 — стрессовое воздействие; 3 — 1 ч постстрессового периода после стрессового воздействия; 4 — 24 ч постстрессового периода после стрессового воздействия. На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 14$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при $P < 0.05$ (*); $P < 0.001$ (***).

гах мха достоверно увеличивалось только к 24 ч в последующий постстрессовый период после воздействия отрицательной температуры: на 2% по сравнению с побегами, подвергнутыми холодной обработке, и на 4% по сравнению с контролем. Содержание Вио в побегах мха постепенно снижалось, и через 24 ч после стрессового воздействия его количество падало до уровня, обнару-

живаемого в побегах сразу же после стрессовой обработки (табл. 1).

Обработка побегов мха *H. splendens* повышенной температурой, так же, как и при воздействии отрицательной температуры, приводила к заметному снижению содержания каротиноидов, их количество уменьшалось почти в 3 раза по сравнению с контролем (табл. 1). При этом заметных изменений в содержании основных каротиноидов — Лют и β -кар не наблюдалось. Достоверно увеличивалось содержание Зеа, через 24 ч в последующий постстрессовый период его количество было выше на 1.3% по сравнению с побегами, подвергнутыми обработке, и на 3.3% по сравнению с контролем. Снижение содержания Вио, обусловленное температурным стрессом, наблюдалось и в постстрессовый период. Через 24 ч выдерживания мха при оптимальной температуре его количество было на 1.7% меньше, по сравнению с его уровнем в побегах мха сразу же после воздействия повышенной температуры (табл. 1).

Экспрессия гена биосинтеза лютеина HsLUT1 в побегах мха H. splendens в условиях температурного стресса

Ранее нами были клонированы и секвенированы десять генов биосинтеза каротиноидов мха *H. splendens* [18]. В настоящей работе мы проанализировали изменение относительного уровня транскриптов основного гена биосинтеза лютеина *HsLUT1* при действии низкой отрицательной (-20°C) и положительной (30°C) температур (рис. 1). Так, достоверное 5-кратное увеличение относительного уровня транскриптов *HsLUT1* наблюдалось при действии -20°C в течение 1 ч. При действии 30°C также происходило достоверное повышение относительного уровня транскриптов *HsLUT1*, но в меньшей степени, в 4 раза.

Изменения фотосинтетических параметров в побегах мха H. splendens в условиях температурного стресса

Было показано, что 1 ч воздействие неблагоприятных температур приводило к достоверному снижению NPQ, причем более сильные изменения наблюдались при воздействии отрицательной температуры (рис. 2). Разнонаправленные изменения NPQ наблюдались в постстрессовый период. Так, через 1 ч выдерживания мха при оптимальной температуре после воздействия отрицательной температуры уровень NPQ повышался в 8 раз, восстанавливаясь до контрольного уровня, а при воздействии повышенной температуры он практически не изменялся. В последующем через 24 ч постстрессового периода после воздействия обеих неблагоприятных температур значения NPQ существенно не изменялись (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение своего жизненного цикла растения испытывают воздействие различных видов стрессовых воздействий, таких как засуха, засоление и высокая температура. Знание о механизмах чувствительности и/или устойчивости видов растений к изменяющимся условиям внешней среды является необходимым условием для обеспечения выживания растений, сохранения их генотипа и поддержания разнообразия флоры. Растения выработали различные механизмы устойчивости к стрессу, включая регуляцию фотосинтеза; детоксикацию активных форм кислорода (АФК) за счет усиления активации антиоксидантных ферментов и накопления низкомолекулярных антиоксидантов; а также накопления вторичных метаболитов, в частности, каротиноидов [19]. Согласно современным представлениям, основными биологическими функциями каротиноидов являются светособирающая, антиоксидантная, фотопротекторная и структурная функции [19, 20]. Многочисленными исследованиями доказано, что уровень каротиноидов в растениях может быть связан со стрессовой устойчивостью. Например, устойчивость к солевому стрессу у бобов тесно коррелирует с устойчивым уровнем каротиноидов, а сахарный тростник повышает свою солеустойчивость за счет снижения содержания хлорофилла и стабильного уровня каротиноидов [19]. При произрастании живучки ползучей в открытых местообитаниях, и соответственно, в условиях высокой инсоляции, адаптивными реакциями в растениях являлись уменьшение содержания хлорофиллов в листьях и светособирающих комплексов (ССК) фотосистем, активирование конверсии пигментов в ВКЦ с накоплением Зеа (деэпоксидации подвергалось до 80% пула Вио) [6]. В работе Arroniz-Crespo с соавт. идентифицирован состав каротиноидов мха *H. splendens* и показаны изменения в их содержании при воздействии УФ-Б облучения [21]. К сожалению, в литературе имеется крайне ограниченная информация об изменениях пула каротиноидов в растениях при действии неблагоприятных температур. В связи с этим основной целью настоящей работы была оценка изменений профиля каротиноидов в побегах мха *H. splendens* при действии неблагоприятных температур. Состав каротиноидов мха *H. splendens* соответствует имеющимся литературным данным [21], за исключением Ант, не детектируемым в экстрактах мха. Можно полагать, что содержание этого ксантофилла во мхе очень мало. Основными каротиноидами являются Лют и β -кар. Дополнительно в составе каротиноидов мха показано наличие α -кар, на долю которого приходится в среднем 1%. Три каротиноида, обнаруженные в экстракте мха, точно идентифицировать не удалось, однако, основываясь на литературных данных [16, 17], каротиноиды (н.и. 2 и н.и. 3) могут

быть отнесены к α -криптоксантину и β -криптоксантину, соответственно. Показано, что воздействие обеих неблагоприятных температур вызывает существенное снижение общего содержания каротиноидов. При этом анализ индивидуальных каротиноидов позволил установить, что именно содержание Вио резко падает при стрессовой обработке, и даже через 24 ч выдерживания мха при оптимальной температуре после воздействия его уровень не восстанавливается до контрольного уровня, а, напротив, становится еще меньше (табл. 1). Общим изменением в профиле каротиноидов мха *H. splendens* при действии обеих неблагоприятных температур является увеличение содержания Лют, Зеа и β -кар, наблюдаемое непосредственно после стрессовой обработки и в постстрессовом периоде (через 24 ч). На рис. 3 представлена схема пути биосинтеза каротиноидов у растений. Типичные каротиноиды (тетра-терпены) синтезируются из первого каротиноидного фитоена, который образуется в результате конденсации двух молекул геранилгеранилдифосфата. Как видно из схемы биосинтеза каротиноидов, Лют образуется из α -кар. Содержание этого ксантофилла наибольшее в фотосинтетическом аппарате высших растений. Он выполняет такие важные функции, как стабилизация структуры антенных белков, светособирающая и фотопротекторная функции [6, 7]. Увеличение содержания Лют в побегах мха при действии неблагоприятных температур (табл. 1) коррелирует с данными [23], где показано, что при низких положительных температурах в связи с ростом вероятности образования АФК в ССК фотосинтетического аппарата наблюдается накопление Лют, выполняющего в этом случае функцию антиоксиданта. В связи с тем, что Лют является преобладающим каротиноидом мха *H. splendens*, представлялось целесообразным проанализировать изменения экспрессии гена его биосинтеза в ответ на действие неблагоприятных температур. Основным ферментом биосинтеза лютеина является каротин ϵ -монооксигеназа — CYP97C1 или LUT1 [24]. Это фермент, катализирующий стереоспецифическую реакцию, является представителем семейства 97 цитохрома P450 — наиболее древних растительных P450. Ранее сообщалось, что в стареющих листьях *A. thaliana* экспрессия *AtCYP97C1* значительно снижалась, что сопровождалось снижением содержания каротиноидов α -каротиновой ветви пути биосинтеза [25]. В наших экспериментах показано, что экспрессия *HsLUT1* при действии отрицательной и положительной температур увеличивается в 5 и 4 раза, соответственно (рис. 1), что согласуется с данными по стресс-индуцированному увеличению содержания каротиноидов α -каротиновой ветви пути биосинтеза (α -кар и Лют) (табл. 1). Таким образом, можно полагать, что *HsLUT1* вовлечен в реакции мха

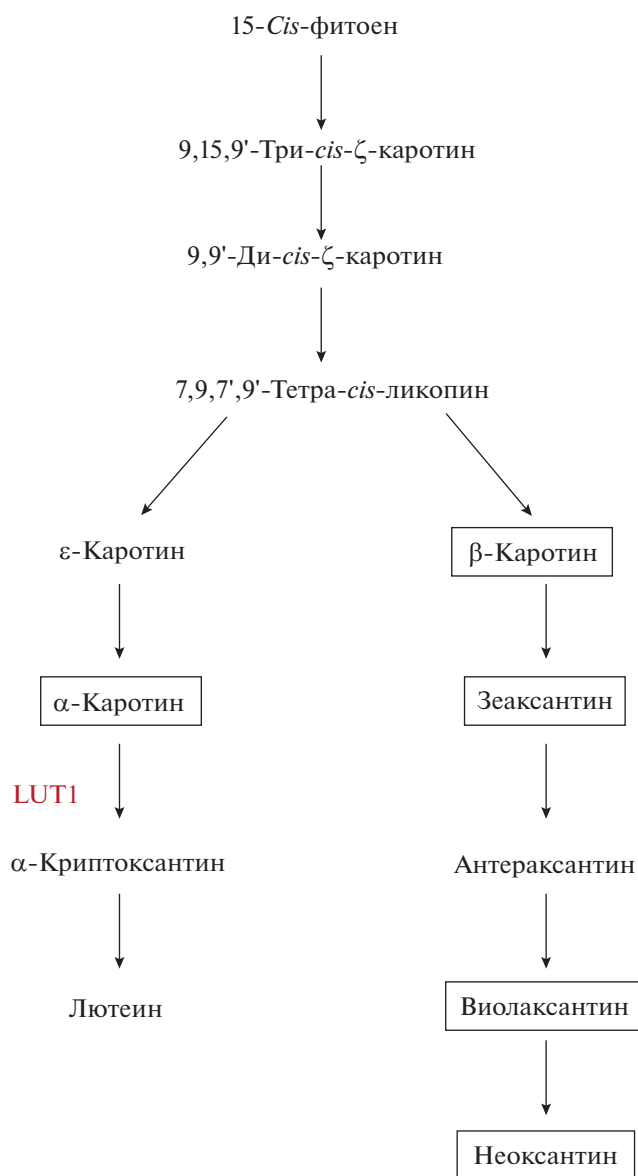


Рис. 3. Схема пути биосинтеза каротиноидов у растений. Прямоугольником показаны метаболиты, которые количественно были определены в данном исследовании. Показан фермент LUT1 — каротин ϵ -монооксигеназа, анализ гена которого проводился в данном исследовании.

H. splendens на температурный стресс. При гидроксигировании β -кар образуется Зеа, ключевой участник ВКЦ. Поскольку в общей сумме каротиноидов мха увеличивается содержание β -кар и Зеа, можно предположить, что в условиях температурного стресса активируется биосинтез непосредственно β -кар, тогда как прирост Зеа, по-видимому, обусловлен степенью дезоксидации Вио. Действительно, его содержание резко падает, как при действии отрицательной, так и повышенной температур (табл.1). Повышение уровня β -кар в побегах мха, обладающего высокими ан-

тиоксидантными свойствами, может обеспечивать защиту мембран, ДНК и других клеточных структур от окислительного повреждения, вызванного воздействием неблагоприятных температур. Кроме того, β -кар, входящий в структуру реакционных центров фотосистемы I и II (ФС I и ФС II), может способствовать сохранению этих комплексов [20]. Не менее важным является повышение уровня Зеа в побегах мха (табл. 1). Известно, что он играет роль антиоксиданта и стабилизатора структуры мембран, участвуя в детоксикации АФК и подавляя перекисное окисление липидов [7]. Надо отметить, что Зеа играет ключевую роль в защите ФС II от фотоингибирования вследствие увеличения теплового рассеивания той части энергии, которая не используется для фотосинтетического электронного транспорта. Обычно увеличение пула Зеа при стрессовых воздействиях находится в прямой зависимости с показателем NPQ [7]. В наших экспериментах, несмотря на увеличение содержания Зеа, показатель NPQ существенно падает, причем более выражено при воздействии отрицательной температуры. Далее, в постстрессовый период после воздействия отрицательной температуры, он восстанавливается до контрольного уровня, а после воздействия повышенной температуры уровень NPQ не изменяется (рис. 2). Объяснить наблюдаемый эффект сложно, можно только предположить, что повышение уровня каротиноидов в условиях температурного стресса, главным образом, обусловлено необходимостью “тушить” синглетный кислород. Известно, что Зеа играет важную роль в стрессовой устойчивости растений к холоду. Например, в работе Tang с соавт. было показано, что предварительная обработка Зеа повышает устойчивость проростков перца к холоду, снижает повреждение листьев от охлаждения, увеличивает биомассу растений и содержание фотосинтетических пигментов в условиях холодного стресса. Было также установлено, что экзогенный Зеа повышает устойчивость к холоду, индуцируя накопление эндогенного Зеа [26]. Таким образом, было выявлено, что изменения экспрессии гена *HsLUT1* при температурном стрессе сопровождаются изменениями содержания каротиноидов. Полученные приоритетные данные расширяют наше знание о механизмах устойчивости у мохообразных и будут способствовать пониманию эволюционных изменений стрессовой устойчивости высших растений. Авторы А.Г. Ренкова и В. Р. Хабибрахманова внесли одинаковый вклад в данную работу. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-24-00595). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sabovljevic M., Bijelovic A., Grubisic D. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds // *Med Raw*. 2001. V. 21. P. 17.
2. Krinsky N.I. Antioxidant function of carotenoids // *Free Radical Biol. Med*. 1989. V. 7. P. 617. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90143-3)
3. Meier S., Tzfadia O., Vallabhaneni R., Gehring C., Wurtzel E.T. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Syst. Biol*. 2011. V. 5. P. 77. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-77>
4. Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. "Carotenoids and photosynthesis," in *Carotenoids in Nature*. Springer: Cham, Switzerland, 2016. P. 111.
5. Falkowski P.G., Raven J.A. *Aquatic photosynthesis*. Malden. USA: Blackwell Sci., 1997. 375 p.
6. Дымова О.В., Захожий И.Г., Головкин Т.К. Возрастные и адаптивные изменения фотосинтетического аппарата листьев зимне-зеленого травянистого растения *Ajuga reptans* L. в природных условиях таежной зоны // *Физиология растений*. 2023. Т. 70. С. 577.
7. Demming-Adams B., Garab G., William Adams III, Govindjee. *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria*. Springer Dordrec, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1>
8. Hou X., Rivers J., León P., McQuinn R.P., Pogson B.J. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants // *Trends Plant Sci*. 2016. V. 21. P. 792. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
9. Jia K., Baz L., Al-Babili S. From carotenoids to strigolactones // *J. Exp. Bot*. 2017. V. 69. P. 2189. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx476>
10. Chaundhary N., Nijhawan A., Khurana J.P., Khurana P. Carotenoid biosynthesis genes in rice: structural analysis, genomewide expression profiling and phylogenetic analysis // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. V. 283. P. 13.
11. Ruiz-Sola M.A., Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10: e0158. 2012. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>
12. Takemura M., Maoka T., Misawa N. Carotenoid analysis of a liverwort *Marchantia polymorpha* and functional identification of its lycopene b- and e-cyclase genes // *Plant Cell Physiol*. 2014. V. 55. P. 194. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct170>
13. He J., Li P., Huo H., Liu L., Tang T., He M., Huang J., Liu L. Heterologous expression of HpBHY and CrBKT increases heat tolerance in *Physcomitrella patens* // *Plant Diversity*. 2019. V. 41. P. 266. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.04.001>
14. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Фотосинтетический аппарат мха гилокомиума блестящего устойчив к низким экстремальным температурам // *Экология*. 2023. №6. (в печати).
15. Дымова О.В., Кузванова О.А. Оптимизация способа экстракции фотосинтетических пигментов и их содержание в талломах лишайников // *Химия растительного сырья*. 2018. № 2. С. 137. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018023013>
16. Jiao Y., Reuss L., Wang Y. β -Cryptoxanthin: chemistry, occurrence, and potential health benefits // *Curr. Pharmacol*. 2019. V. 5. P. 20. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00168-7>
17. Gama J.J.T., Sylos C.M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC // *Food Res. Intern*. 2005. V. 38. P. 899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.008>
18. Renkova A.G., Koulintchenko M.V., Mazina A.B., Leksin I.Y., Minibayeva F.V. Identification, characterization, and expression analysis of carotenoid biosynthesis genes in the moss *Hylocomium splendens* // *Theor. Exp. Plant Physiol*. 2023. (в печати).
19. Wahid A., Ghazanfar A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane // *J. Plant Physiol*. 2006. V. 163. P. 723. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.07.007>
20. Swapnil P., Meena M., Singh S.K., Dhuldhaj U., Harish Marwal A. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects // *Curr. Plant Biol*. 2021. V. 26. P. 100203. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100203>
21. Arróniz-Crespo M., Gwynn-Jones D., Callaghan T.V., Núñez-Olivera E., Martínez-Abaigar J., Horton P., Phoenix G. K. Impacts of long-term enhanced UV-B radiation on bryophytes in two sub-Arctic heathland sites of contrasting water availability // *Ann. Bot*. 2011. V. 108. P. 557. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr178>
22. Huang J., Zhong Y., Liu J., Sandmann G., Chen F. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin // *Metab. Eng*. 2013. V. 17. P. 59. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.02.005>
23. Popova A.V., Dobrev K., Velitchkova M., Ivanov A.G. Differential temperature effects on dissipation of excess light energy and energy portioning in lut2 mutant of *Arabidopsis thaliana* under photoinhibitory conditions // *Photosyn. Res*. 2019. V. 139. P. 367. <https://doi.org/10.1007/s11220-018-0511-2>
24. Tian L., Della Penna D. Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants LUT1 // *Arch Biochem. Biophys*. 2004. V. 430. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.003>
25. Breeze E., Harrison E., Mchattie S., Hughe, L., Hickman R., Hill C. High-breeze resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 873. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083345>
26. Tang C., Xie J., Ly J., Li J., Zhang J., Wang C., Liang G. Alleviating damage of photosystem and oxidative stress from chilling stress with exogenous zeaxanthin in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings // *Plant Physiol. Biochem*. 2021. V. 163. P. 395. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.010>

УДК 581.182.261.1574.5

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Nitzschia amabilis* H. SUZUKI

© 2023 г. С. Л. Полякова^а, *, С. Н. Железнова^б, Р. Г. Геворгиз^б, Н. А. Давидович^а

^аКарадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник Российской академии наук — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук”, Феодосия, Республика Крым, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук”, Севастополь, Республика Крым, Россия

*e-mail: sviatlana.poliakova.77@mail.ru

Поступила в редакцию 21.08.2023 г.

После доработки 13.09.2023 г.

Принята к публикации 14.09.2023 г.

Работа посвящена изучению эколого-физиологических свойств, продукционных и биохимических характеристик диатомовой водоросли *Nitzschia amabilis*. Определен оптимум по солености (35–36‰), освещенности (2.95 клк) и фотопериоду (14 ч), при котором достигается наибольшая удельная скорость роста клеток. Установлен коэффициент светового насыщения (I_k), который оказался меньше единицы, что говорит о высокой энергоэффективности фотосинтеза. Результаты экспериментов по солености показали способность водоросли расти в диапазоне 4–68‰, свидетельствуя о ее относительно широкой эвригалинности. Изучен биохимический состав *N. amabilis* при накопительном культивировании. В целом у исследуемого штамма преобладали полиненасыщенные жирные кислоты, доминирующими были эйкозопентаеновая, арахидоновая и докозагексаеновая. Основная доля насыщенных жирных кислот приходилась на пальмитиновую кислоту. Установлены показатели продуктивности *N. amabilis* в отношении липидов, фукоксантина и ПНЖК, которые в 2.5–3 раза выше в проточном режиме культивирования, чем в накопительном.

Ключевые слова: *Nitzschia amabilis*, биохимический состав, диатомовые водоросли, культивирование, освещенность, соленость

DOI: 10.31857/S0015330323600572, EDN: CVGKQV

ВВЕДЕНИЕ

Диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*) являются одними из самых многочисленных и разнообразных фотоавтотрофов на планете [1]. Способность адаптироваться к различным экологическим средам обитания и производить биомассу богатую разнообразными соединениями, которую возможно применять в медицине, пищевой и косметической промышленности, в сельском хозяйстве, при производстве биотоплива и т.д., делает их биотехнологически привлекательным ресурсом. Известно, что некоторые виды диатомовых способны накапливать до 50% полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) от общего количества жирных кислот в сухой биомассе, среди них длинноцепочечные ПНЖК омега-3 и омега-6 [2, 3].

Как известно удельная скорость роста биомассы микроводорослей является важным фактором

для потенциального их использования в биотехнологических производствах, активно развивающихся в последние десятилетия. Поэтому первоочередной и важной задачей является поиск и введение в культуру высокопродуктивных видов микроводорослей, определение оптимальных условий и технологий культивирования при минимальных экономических затратах, включая энергетические [4].

Среди множества диатомовых водорослей, которые синтезируют биологически активные вещества, особый интерес представляют бентосные виды, отличительной особенностью которых является способность интенсивно расти при пониженной освещенности и температуре, а также оседать на дно, что позволяет достаточно просто осуществлять сбор урожая и в значительной мере упрощает процесс производства биомассы микроводорослей в промышленных масштабах. Оче-

видна целесообразность поиска новых “видов-продуцентов” с широким диапазоном толерантности к меняющимся абиотическим факторам именно среди бентосных микроводорослей *Bacillariophyta*.

В ходе наблюдений за выделенными и введенными в культуры видами бентосных диатомовых водорослей нами был выявлен быстро нарастающий вид из рода *Nitzschia* Hassall, определенный нами как *Nitzschia amabilis* H. Suzuki. Ознакомление с тематической литературой [5–11] указало на малую изученность эколого-физиологических свойств этой водоросли, знание которых является критически важным для выбора объектов культивирования.

Цель данной работы заключалась в изучении некоторых эколого-физиологических свойств, продукционных и биохимических характеристик диатомовой водоросли *Nitzschia amabilis* перспективной для практического (economic) культивирования ввиду ее высоких темпов деления и накопления ценных метаболитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Nitzschia amabilis (рис. 1) довольно широко распространенная бентосная пеннатная диатомовая водоросль [11]. Из проб, отобранных в Атлантическом океане у побережья острова Гран Канария (Gran Canaria, архипелаг Канарских островов), в лабораторных условиях микропипеточным способом [12] с использованием инвертированных оптических микроскопов Nib-100 и Bif-100 (“Biobase”, Китай), выделен и введен в культуру штамм 20.0515-SK. Культуру содержали в конических колбах Эрленмейера объемом 100 мл в комнате с постоянным температурным режимом $20 \pm 1^\circ\text{C}$ при естественном освещении. В качестве среды использовали искусственную морскую воду соленостью 36‰, приготовленной по рецепту ESAW с модификациями [13]. Для поддержания культуры в фазе экспоненциального роста осуществляли пересев в свежую среду с недельной периодичностью.

Для определения оптимума солености, при котором достигается наиболее интенсивный темп деления, посевы осуществляли в чашки Петри диаметром 5 см в среду с разной соленостью (0, 4, 10, 18, 30, 36, 48, 68, 96, 110‰). Приняв во внимание оптимум солености, для установления оптимальных условий освещения мы поместили чашки Петри в условия освещенности 4.75, 2.95, 2.00, 1.50, 1.05, 0.66 клк при заданных фотопериодах (10- и 14-часовом, совпадавшем по продолжительности с естественным фотопериодом в это время года (апрель), а также непрерывном в течение сут). Эксперименты по изучению влияния солености и интенсивности света на удельную

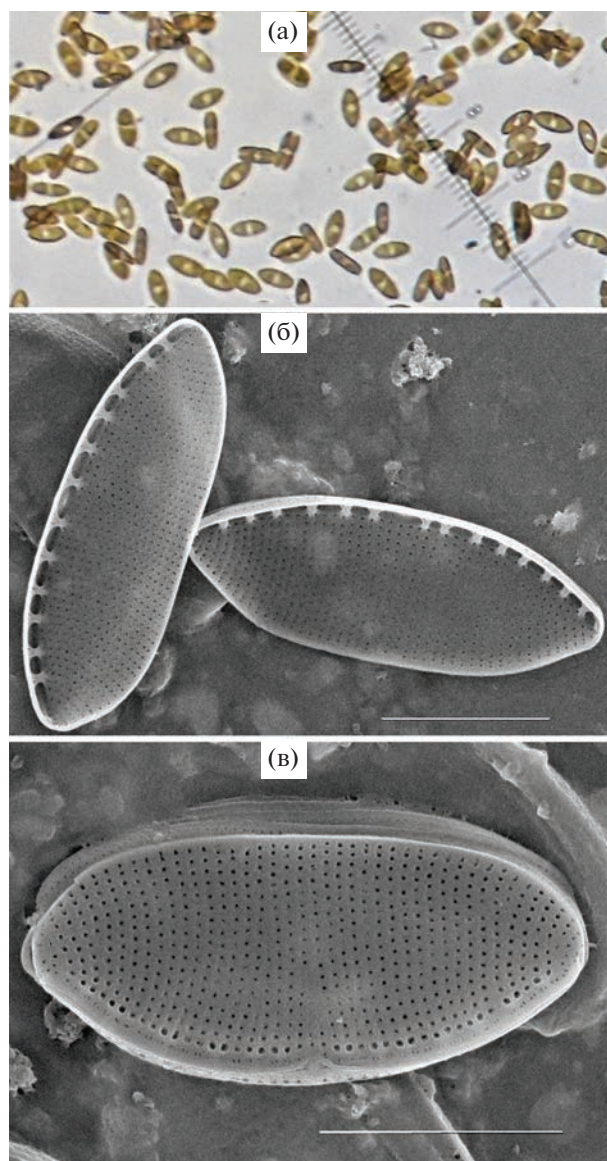


Рис. 1. *Nitzschia amabilis* H. Suzuki, клетки клона 20.0515-SK (а) – общий вид клеток, (б, в) – фрагменты створок, с фибулами, пороидами и штрихами; (а) – световая микроскопия, (б, в) – сканирующая электронная микроскопия. Масштаб – 5 мкм.

скорость роста *N. amabilis* проводили в фазе экспоненциального роста.

Для описания кривых роста в зависимости от интенсивности освещения использовали уравнение, позволяющие описывать параболические зависимости [14]:

$$\mu = \mu_m (1 - \exp(-\lambda I)), \quad (1)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость роста, μ – удельная скорость роста при определенной интенсивности света, λ – коэффициент крутизны кривой, вычисляемой из отношения:

$$\lambda = \sum \ln(1 - \mu/\mu_m) / \sum I, \quad (2)$$

где $\sum I$ — сумма интенсивностей света (клк), при которой проводились измерения удельной скорости роста.

Для определения области светового насыщения (I_k), два прямолинейных участка кривой интерполировали до пересечения. Точка пересечения, отнесенная к оси абсцисс, принималась за константу светового насыщения.

Измерения длины клеток производили на микроскопе Biolar PI (“PZO”, Польша) с помощью окулярной линейки, калиброванной по объект-микрометру. Фотографии сделаны при помощи микроскопа Bioptic C300 (“Biopic”, Китай), оснащенного камерой Moticam (“Motic”, Китай). Электронные фотографии панцирей получены на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Hitachi SU3500 (“Hitachi”, Япония). Для СЭМ проводили пробоподготовку материала, для чего суспензию клеток объемом 5–8 мл помещали в пробирку затем заливали дистиллированной водой, через 3 дня центрифугировали и заменяли половину дистиллята 35% перекисью водорода. Кипятили на песчаной бане два дня по 4 ч в день. После полного обесцвечивания пробы осадок промывали дистиллированной водой не менее 5 раз. Фотографии использованы для биометрических измерений и для определения видовой принадлежности штамма.

Удельную скорость роста (r , сут^{–1}) рассчитывали, исходя из уравнения экспоненциального роста численности клеток в культуре:

$$N_t = N_0 \exp(r(t - t_0)), \quad (3)$$

где N_t и N_0 — число клеток в момент времени t и в начальный момент времени t_0 соответственно, откуда

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0). \quad (4)$$

После преобразования уравнения (3) к линейному виду значение коэффициента r линейной регрессии рассчитывали методом наименьших квадратов по четырем-пяти точкам, соответствующим дням подсчета численности клеток, которую определяли как среднее значение для 15 полей зрения микроскопа в первой и во второй серии экспериментов. Для перехода от удельной скорости роста к темпу деления (k , удвоений сут^{–1}), полученные значения r делили на $\ln(2)$ в соответствии с уравнением [12]:

$$k = r / 0.6931.$$

Время удвоения численности (T_2), выраженное в тех же единицах, что и для удельной скорости роста можно рассчитать, используя уравнение:

$$T_2 = 0.6931 / r.$$

Интенсивное культивирование

Интенсивную культуру *N. amabilis* получали при постоянной температуре суспензии $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объемом 3 л, слоем 5 см, при круглосуточном освещении белыми люминесцентными лампами СЕРИЛ1LF36W/54-765 (“SVET24.BY” Польша), на питательной среде RS, подобранной для интенсивного культивирования *Cylindrotheca closterium* [15], концентрация компонентов которой уменьшена в 2 раза. Средняя облученность рабочей поверхности фотобиореактора составляла 150 мкмоль квантов м^{–2} с^{–1} (33 Вт м^{–2}). В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1.2 л воздуха на 1 л культуры в минуту) посредством компрессорной установки SERA air 550 R plus (“SERA”, Германия). Плотность культуры в начале накопительного культивирования составляла 0.2 г сухого вещества на 1 л.

Для определения плотности культуры сначала взвешивали сырую массу *N. amabilis* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах CAUY-120 (“Cas”, Южная Корея) с погрешностью 0.1 мг после осаждения клеток центрифугированием (ОПН-3 при 3000 об мин^{–1} 1600 g в течение 2 мин), затем рассчитывали сухую массу, используя экспериментально полученный коэффициент связи между сухой и сырой массой ($k = 0.11$). Удельную скорость роста (r) рассчитывали по формуле (3).

Содержание белков в биомассе определяли по методу Лоури [16]. Концентрацию липидов определяли фосфованилиновым методом [17].

Липиды экстрагировали из 20 г сырой биомассы водорослей смесью хлороформ-этанол (2:1) до полного обесцвечивания биомассы. Экстракт 3–4 раза промывали водой для удаления нелипидных примесей. Содержание общих углеводов в биомассе определяли по методу Дюбуа [18]. Массовую долю золы водоросли устанавливали методом определения зольного остатка [17]. За окончательный результат измерения принимали среднее арифметическое значение двух результатов измерений. Фукоксантин в биомассе определяли методом тонкослойной хроматографии [19]. Содержание жирных кислот (ЖК) в составе суммарных липидов и метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) выполняли по методу Кейтс [20], с пробоподготовкой, детально описанной в работе [21, 22].

МЭЖК определяли на газовом хроматографе Хроматэк Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение МЭЖК проводили на капиллярной колонке BPX5 (“SGE Analytical Science”) длиной 60 м с внутренним диаметром 0.25 мм с толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм в температурном интер-

вале от 40 до 280 еС в режиме программирования температуры. В качестве внешнего стандарта использовали смесь кислот “Supelco 37 component FAME mix”. Количественные значения МЭЖК получены путем сравнения относительных времен удерживания экспериментальных хроматограмм с хроматограммой смеси МЭЖК “Supelco 37 component FAME mix”.

Все измерения проводили в двух биологических и четырех аналитических повторностях. Статистическая достоверность основных параметров культивирования (сухая масса, содержание каротиноидов, фукоксатина, липидов и белков, число клеток), а также элементного состава оценивали при помощи стандартного критерия Стьюдента (t -критерий, $P = 0.95$). На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольшая удельная скорость роста у *N. amabilis* (до трех делений в сут.) наблюдался в среде океанической соленостью 35–36‰ (рис. 2) при 14-часовом фотопериоде и освещенности 2.95 клк (рис. 3). В результате экспериментов была установлена способность водоросли расти в диапазоне соленостей 4–68‰, что свидетельствует о ее относительно широкой эвригалинности. В целом около трех делений в сут. наблюдалось при освещенности в промежутке от 2.00 до 4.75 клк.

На рис. 3 стрелкой отмечен коэффициент светового насыщения (I_k), который для 14-часового фотопериода оказался меньше единицы, что свидетельствует о минимальных энергетических затратах при достаточно высоком темпе деления.

Для исследования биохимических характеристик получена интенсивная культура с максимальной плотностью 12 г л⁻¹ сырой массы или 1.44 г л⁻¹ сухой массы.

После посева экспоненциально растущей культуры кривая роста *N. amabilis* в накопительной культуре характеризуется наличием экспоненциальной фазы в течение первых 3 сут, сменяющейся фазой замедления роста с последующим переходом в стационарную фазу. Культура достигала максимальной плотности на 8 сут выращивания (рис. 4). Для исследования биохимических характеристик получена интенсивная культура с максимальной плотностью 12 г л⁻¹ сырой массы или 1.44 г л⁻¹ сухой массы. Максимальная удельная скорость роста, определенная по изменению биомассы, составила 0.6 сут⁻¹ ($R^2 = 0.99$). На линейном участке роста максимальная продуктивность культуры составила 0.15 г л⁻¹ сут⁻¹ ($R^2 = 0.98$).

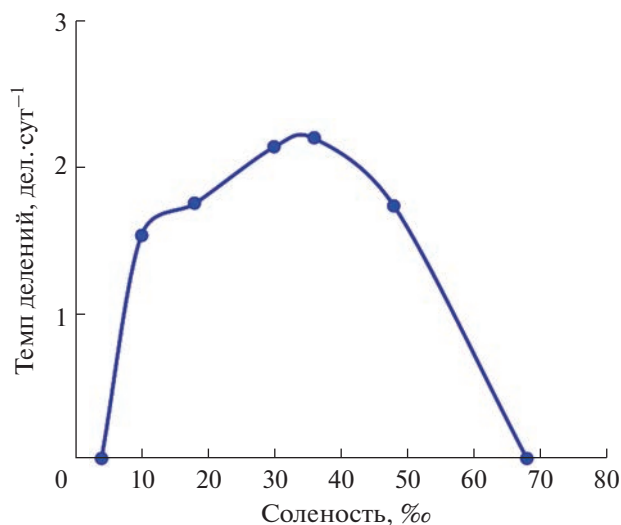


Рис. 2. Зависимость темпа деления клеток диатомовой водоросли *N. amabilis* от количества растворенных солей в искусственно приготовленной морской среде ESAW.

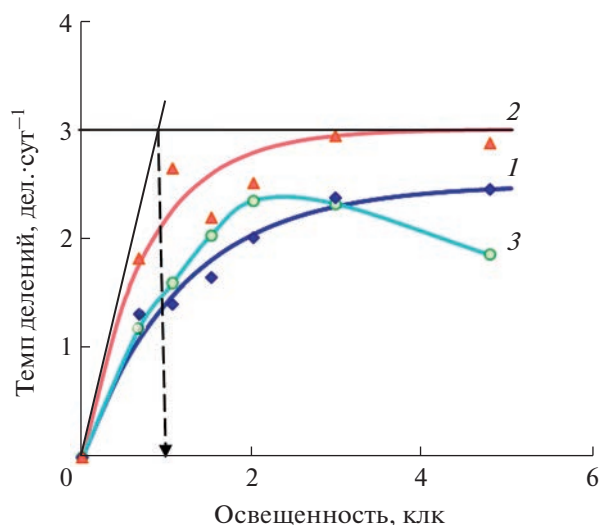


Рис. 3. Зависимость темпа деления *Nitzschia amabilis* от освещенности при разных фотопериодах: 1 — 10 ч, 2 — 14 ч, 3 — 24 ч.

Биохимический состав биомассы *N. amabilis* в разных фазах роста при накопительном культивировании представлен в табл. 1. По нашим данным при накопительном культивировании содержание массовой доли суммарных белков изменялось в зависимости от фазы роста от 40 до 45% сухой массы на 8 сут.

В экспоненциальной фазе роста в биомассе *N. amabilis* зарегистрированы относительно небольшие концентрации липидов и ПНЖК, которые возрастают в четыре раза при переходе культуры в стационарную фазу.

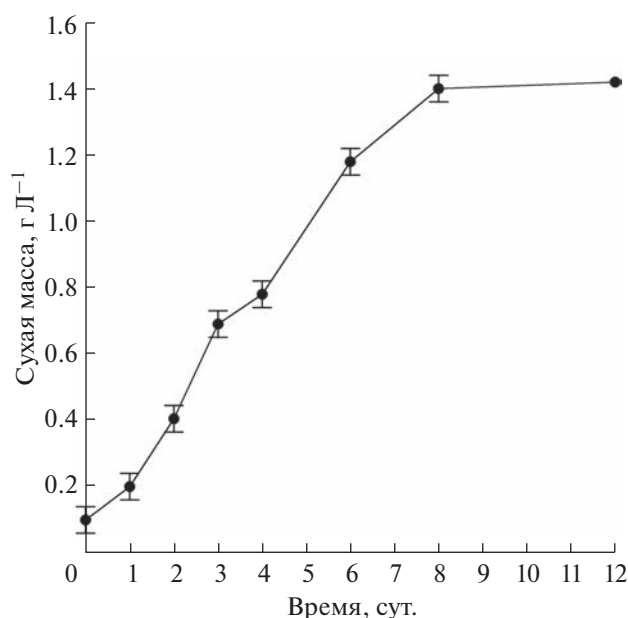


Рис. 4. Динамика плотности интенсивной культуры диатомовой водоросли *Nitzschia amabilis*.

Также в стационарной фазе и в фазе замедления роста наблюдалось активное накопление фукоксантина. В начале стационарной фазы роста (8 сут эксперимента) концентрация фукоксантина составляла 13.0 ± 0.4 мг г⁻¹ сухой массы (18.7 мг л⁻¹), на 12 сут эксперимента (5 сут стационарной фазы) концентрация фукоксантина достигала 17.0 ± 0.4 мг/г сухой массы (24.5 мг л⁻¹). Таким образом, скорость накопления фукоксантина в стационарной фазе роста составила 1.45 мг л⁻¹ сут⁻¹.

В составе ЖК изученного штамма на 8 сут роста были обнаружены ЖК с длиной цепи от 14 до 22 углеродных атомов (табл. 2).

Доминирующей среди мононенасыщенных жирных кислот была пальмитолеиновая, концентрация которой достигала 12.83 мг г⁻¹ сухой массы (36% от суммы ЖК). Среди полиненасыщенных

жирных кислот доминирующими были эйкозапентаеновая (24.72 мг г⁻¹ сухой массы или 16.2% от суммы ЖК), арахидоновая (7.9 мг г⁻¹ сухой массы или 8.5% от суммы ЖК) и докозагексаеновая (5.7 мг г⁻¹ сухой массы). Основная доля насыщенных ЖК приходилась на пальмитиновую кислоту ($C16:0$ 4.5 мг г⁻¹ сухой массы). В целом у исследуемого штамма преобладали ПНЖК (42 мг г⁻¹ сухой массы) при соотношении $\omega 6/\omega 3$ равном 0.3.

Рассчитана средняя скорость накопления каждой ЖК за весь период накопительного культивирования (табл. 3).

Следует отметить, что показатели продуктивности *N. amabilis* в отношении липидов, фукоксантина и ПНЖК в 2.5–3 раза выше в проточном режиме культивирования, чем в накопительном (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных источников известно, что темп клеточного деления для многих изученных видов редко превышает три деления в сутки, при этом коэффициент светового насыщения составляет от 3 до 9 клк [14]. У исследуемого вида *N. amabilis* энергетические затраты при высоком темпе деления ниже, чем у большинства изученных видов. При этом биохимический анализ показал, что *N. amabilis* наряду с морскими диатомеями *Odontella aurita*, *Attheya longicornis*, *Porosira glacialis* [23, 24], характеризуется высокой концентрацией докозагексаеновой кислоты в отличие от других бентосных диатомовых, таких как *Cylindrotheca closterium*, *Nanofrustulum shiloi*, *Entomoneis paludosa* [25]. Данный факт имеет большое прикладное значение, поскольку доминирующие эйкозапентаеновая, арахидоновая и докозагексаеновая кислоты обладают профилактическим действием против сердечнососудистых заболеваний, проявляют антимикробную и противоопухолевую активность [26].

Таблица 1. Биохимический состав диатомовой водоросли *Nitzschia amabilis* при накопительном культивировании

Состав	Фазы роста	
	экспоненциальная	начало стационарной фазы
Липиды, %	4.0 ± 0.1	16.0 ± 0.1
Белки, %	45.0 ± 0.4	40.0 ± 0.4
Углеводы, %	25.0 ± 0.2	17.0 ± 0.2
Зола, %	25.0 ± 0.3	27.0 ± 0.3
ПНЖК, мг г ⁻¹	10.0 ± 0.5	42.3 ± 0.5
Фукоксантин, мг г ⁻¹	8.0 ± 0.4	13.0 ± 0.4

Таблица 2. Жирнокислотный состав исследуемого штамма *Nitzschia amabilis*

Название ЖК	% от суммы ЖК	Концентрация, мг г ⁻¹ сухой массы
Миристиновая (C14:0)	6.7 ± 0.06	1.80 ± 0.04
Пентадекановая (C15:0)	0.64 ± 0.01	0.17 ± 0.07
Пальмитиновая (C16:0)	16.62 ± 0.56	4.50 ± 0.34
Гептадекановая (C17:0)	0.03	0.035 ± 0.007
Стеариновая (C18:0)	0.38 ± 0.01	0.1 ± 0.3
Сумма НЖК	24.37	6.6 ± 0.4
Мононенасыщенные ЖК		
Пальмитолеиновая (C16:1ω7)	36.27 ± 0.53	12.83 ± 0.53
Элаидиновая кислота транс-9 Octadecenoic acid (E) C18:1 (n-9)	0.92 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Олеиновая Methyl cis-9-octadecenoate (C18:1ω9)	0.79 ± 0.04	0.463 ± 0.01
Сумма МЖК	37.98	13.45
Полиненасыщенные ЖК		
Methyl 6,9,12,15-hexadecatetraenoate	0.73 ± 0.01	0.39 ± 0.01
Гексадекатриеновая (C16:3ω4)	6.6	1.85 ± 0.31
γ-линоленовая (C18:3ω6)	1.59 ± 0.01	0.95 ± 0.01
Линолевая (C18:2ω6)	1.58 ± 0.02	0.58 ± 0.04
Арахидоновая (C20:4ω6)	8.56 ± 0.12	7.9 ± 0.31
цис-8,11,14-Эйкозатриеновая кислота C20:3 n-6	0.28 ± 0.04	0.16 ± 0.02
Эйкозопентаеновая (C20:5ω3)	16.27 ± 0.23	24.72 ± 0.61
Докозагексаеновая (C22:6ω3)	1.85 ± 0.01	5.71 ± 0.03
Сумма ПНЖК	37.48	42.26
МНЖК + ПНЖК	75.46	55.71
НЖК + МНЖК + ПНЖК	99.83%	62.31
ω6/ω3		0.3

Примечание: НЖК — насыщенные жирные кислоты, МНЖК — мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты.

Соотношение ω6/ω3 показывает, что в исследуемом штамме преобладают ω-3 жирные кислоты. Известно, что ω-3 жирные кислоты используются для лечения таких заболеваний как гипертриглицеридемии, связанной с метаболическим синдромом, ожирения, диабета 2 типа и сердечно-сосудистых заболеваний. Продукты с низким соотношением ω6/ω3 ПНЖК (ω6/ω3 ≤ 1) могут использоваться в качестве профилактики и лечения таких заболеваний как аритмия сердца, инсульт и инфаркт миокарда, а также атеросклеротического изменения сосудов [27].

Микроводоросли можно рассматривать как перспективный источник фукоксантина для промышленного производства. Концентрация фукоксантина в микроводорослях значительно выше, чем в макроводорослях. Недавние исследования по-

казали, что фукоксантин и его производные обладают многими полезными эффектами для здоровья, включая противоопухолевое, антигипертензивное и противовоспалительное [28].

В проточном режиме культивирования средняя скорость биосинтеза фукоксантина и липидов у *N. amabilis* выше в 2.5 раза, а скорость биосинтеза полиненасыщенных жирных кислот выше в 2.7 раза. Фукоксантин внутри клетки нейтрализует активные формы кислорода, образующиеся в стрессовых условиях (стационарная фаза роста) и защищает клетку от внешних агрессивных условий среды обитания [29]. Таким образом, проточный режим культивирования для синтеза ценных веществ у *N. amabilis* более предпочтителен, чем накопительный. Проточное культивирование дает возможность достижения оптимальных усло-

Таблица 3. Скорости биосинтеза жирных кислот исследуемого штамма *Nitzschia amabilis* в накопительном режиме культивирования

Название ЖК	Концентрация, мг г ⁻¹ сухого веса	Средняя скорость биосинтеза, мг л ⁻¹ сут ⁻¹
Миристиновая (C14:0)	1.80 ± 0.04	0.29
Пентадекановая (C15:0)	0.17 ± 0.07	0.027
Пальмитиновая (C16:0)	4.50 ± 0.34	0.73
Гептадекановая (C17:0)	0.035 ± 0.007	0.0056
Стеариновая (C18:0)	0.1 ± 0.03	0.016
Сумма НЖК	6.6 ± 0.4	1.1
Мононенасыщенные ЖК		
Пальмитолеиновая (C16:1ω7)	12.83 ± 0.53	2.08
Элаидиновая кислота (E) C18:1 (n-9)	0.19 ± 0.01	0.031
Олеиновая кислота (C18:1ω9)	0.463 ± 0.01	0.007
Сумма МЖК	13.45	2.1
Полиненасыщенные ЖК		
Methyl 6,9,12,15-hexadecatetraenoate	0.39 ± 0.01	0.063
Гексадекатриеновая (C16:3ω4)	1.85 ± 0.31	0.3
γ-линоленовая (C18:3ω6)	0.95 ± 0.01	0.154
Линолевая (C18:2ω6)	0.58 ± 0.04	0.094
Арахидоновая (C20:4ω6)	7.9 ± 0.31	1.283
цис-8,11,14-Эйкозатриеновая кислота C20:3 n-6	0.16 ± 0.02	0.026
Эйкозопентаеновая (C20:5ω3)	24.72 ± 0.61	4.017
Докозагексаеновая (C22:6ω3)	5.71 ± 0.03	0.930
Сумма ПНЖК	42.26	6.86
МНЖК + ПНЖК	55.71	9
НЖК + МНЖК + ПНЖК	62.31	10.1
ω6/ω3	0.3	

Таблица 4. Показатели средней продуктивности исследуемого штамма *Nitzschia amabilis* при накопительном и проточном режимах культивирования

Параметры	Режим культивирования	
	накопительный	проточный
Максимальная плотность культуры	1.4 г л ⁻¹ сухой биомассы	—
Максимальная удельная скорость роста	0.6 сут ⁻¹	—
Максимальная продуктивность	150 мг л ⁻¹ сут ⁻¹	210 мг л ⁻¹ сут ⁻¹
Средняя скорость накопления фукоксантина	1.45 мг л ⁻¹ сут ⁻¹ *	—
	1.1 мг л ⁻¹ сут ⁻¹ **	2.73 мг л ⁻¹ сут ⁻¹
Средняя скорость накопления липидов	13.3 мг л ⁻¹ сут ⁻¹ **	33.6 мг л ⁻¹ сут ⁻¹
Средняя скорость накопления полиненасыщенных жирных кислот	3.2 мг л ⁻¹ сут ⁻¹ **	8.82 мг л ⁻¹ сут ⁻¹

Примечание: * — в стационарной фазе роста; ** — за весь период накопительного культивирования.

вий среды для роста клеток и биосинтеза ценных веществ, что обеспечивает в условиях стационарного динамического равновесия постоянность биохимического состава получаемой биомассы.

Таким образом, *N. amabilis*, характеризующаяся большим содержанием незаменимых ЖК, продемонстрировала высокую энергетическую эффективность при выращивании в культуре в сравнении с другими вышеупомянутыми видами диатомовых и может рассматриваться как перспективный объект для биотехнологии.

Работа выполнена в рамках государственного задания КНС-ПЗ РАН филиала ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов” (№ 121032300019-0). В работе были использованы материалы Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ “Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана”. Биохимический анализ проведен в рамках выполнения темы государственного задания (№ 121030300149-0).

Авторы выражают благодарность Сергею Ивановичу Генкалу, Елене Леонидовне Невровой, Ринату Мухаметшаевичу Гогореву за помощь в определении видовой принадлежности штамма.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mann D.G., Vanormelingen P. An inordinate fondness? The number, distributions and origins of diatom species // J. Eukaryot. Microbiol. 2013. V. 60. P. 414. <https://doi.org/10.1111/jeu.12047>
2. Apt K.E., Behrens P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology // J. Phycol. 1999. V. 35. P. 215.
3. Patil V., Kallqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H.R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquac. Int. 2007. V. 15. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>
4. Liyanaarachchi V.C., Nishshanka G.K.S.H., Premaratne R.G.M.M., Ariyadasa T.U., Nimarshana P.H.V., Malik A. Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress // Biotechnol. Rep. 2020. V. 28: e0053.
5. Hustedt F. Die diatomeenflora des küstengebietes der Nordsee vom dollart bis zur elbemündung. I. Die diatomeenflora in den sedimenten der unteren ems sowie auf den watten in der Leybucht, des Memmert und bei der insel juist // Abhandlungen des NWVs. 1939. V. 31. P. 571.
6. Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroi J.-M., Jeffrey S. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) // Phytochem. 1994. V. 35. P. 155. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90525-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90525-9)
7. Witkowski A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. Diatom flora of marine coasts I. In: Lange-Bertalot H. (Ed.) iconographia diatomologica 7. Königstein: Koeltz Scientific Books, 2000. 895 p.
8. Suzuki H., Nagumo T., Tanaka J. *Nitzschia amabilis* nom. nov., a new name for the marine species *N. laevis* Hustedt // Diatom Res. 2010. V. 25. P. 223. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2010.9705842>
9. Rivera P., Cruces F. Primer registro para Chile de las diatomeas marinas *Nitzschia amabilis*, *Nitzschia elegantula* y *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* // RBMO. 2011. V. 46. P. 95.
10. Kaleli A., Kociolek J., Solak C.N. Taxonomy and distribution of diatoms on the Turkish Mediterranean coast, Dalyan (Muğla) // Mediterranean Marine Sci. 2020. V. 21. P. 201. <https://doi.org/10.12681/mms.17293>
11. Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2023. <https://www.algaebase.org>; searched on 26 September 2023.
12. Andersen R.A., Kawachi M. Traditional microalgae isolation techniques. In: Algal culturing techniques / R. A. Andersen (Ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 2005. P. 83. <https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50007-X>
13. Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // Морской биологический журн. 2018. Т. 3. № 2. С. 73. <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.2.06>
14. Финенко З.З., Ланская Л.А. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды // Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / Под общей редакцией К.М. Хайлова – Киев: Наук. Думка, 1971. С. 22.
15. Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Бобко Н.И., Лелеков А.С. Питательная среда для интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – перспективного объекта биотехнологий // Актуальная биотехнология. 2015. Т. 14. № 3. С. 46.
16. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
17. Агатова А.И., Аржанова Н. В., Лапина Н.М., Налетова И.А., Торгунова Н.И. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и маркикультуры / Под ред. А.И. Агатовой. Москва: ВНИРО, 2004. 123 с.
18. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton Y.K., Reber P.A., Smith F. Colometric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. 1956. V. 28.

- Р. 350.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
19. Рябушко В.И., Железнова С.Н., Нехорошев М.В. Влияние азота на накопление фукоксантина диатомовой водорослью *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // *Algologia*. 2017. Т. 27. № 1. С. 15.
 20. Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. Amsterdam—NY—Oxford: Elsevier, 1986. 464 p.
 21. Gevorgiz R.G., Gontcharov A.A., Zheleznova S.N., Malakhova L.V., Alyomova T.E., Maoka T., and Nekhoroshev M.V. Biotechnological potential of a new strain of *Cylindrotheca fusiformis* producing fatty acids and fucoxanthin // *Bioresource Technology Reports*. 2022. V. 18. P. 101098.
<https://doi.org/10.2139/ssrn.4081779>
 22. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Малахов А.С. Продукционные характеристики культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin в двухступенчатом хемостате // *Морской биологический журн.* 2023. Т. 8. № 1. С. 27.
<https://doi.org/10.21072/mbj.2023.08.1.03>
 23. Pasquet V., Ulmann L., Mimouni V., Guihéneuf F., Jacqueline B., Morant-Manceau A., Tremblin G. Fatty acids profile and temperature in the cultured marine diatom *Odontella aurita* // *J. Appl. Phycol.* 2014. V. 26. P. 2265.
<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0252-3>
 24. Artamonova E.Y., Vasskog T., Eilertsen H.C. Lipid content and fatty acid composition of *Porosira glacialis* and *Attheya longicornis* in response to carbon dioxide (CO₂) aeration // *PLoS ONE*. 2017. V. 12: e0177703.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177703>
 25. Bedoshvili Y., Podunay Y., Nikonova A., Marchenkov A., Bairamova E., Davidovich N., Likhoshway Y. Lipid and fatty acids accumulation features of *Entomoneis* cf. *paludosa* during exponential and stationary growth phases in laboratory culture // *Diversity*. 2021. V. 13. P. 459.
<https://doi.org/10.3390/d13100459>
 26. Yi Z., Xu M., Di X., Brynjolfsson S., Fu W. Exploring valuable lipids in diatoms // *Front. Mar. Sci.* 2017. V. 4. P. 29.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00017>
 27. Preston M., Salim R.M.A. Parenting style, proactive personality, and career decision self-efficacy among senior high school students // *Humanitas Indonesian Psychological J.* 2019. V. 16. P. 116.
 28. Shiratori K., Ohgami K., Ilieva I., Jin X.H., Koyama Y., Miyashita K., Kazuhiko Y., Satoru K., Shigeaki O. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo* // *Exp. Eye Res.* 2005. V. 81. P. 422.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>
 29. Méresse S., Fodil M., Fleury F., Chénais B. Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: a promising bioactive compound for cancer therapy // *Intern. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239273>

УДК 581.1.577.19

АНАЛИЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОКСИЛИПИНОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗНОЙ ВЕТВИ¹

© 2023 г. Я. В. Радзюкевич^а, К. Г. Тихонов^а, Е. А. Дегтярёв^а,
В. И. Дегтярёва^{б,с}, Т. В. Савченко^{а,*}

^аИнститут фундаментальных проблем биологии, Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Пушино, Московская область, Россия

^бМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биотехнологический факультет, Москва, Россия

^сФилиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Пушино, Московская область, Россия

*e-mail: savchenko_t@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Коротко- и среднецепочечные альдегиды и их производные, образующиеся из жирных кислот в результате активности ферментов гидропероксидлиаз, присутствуют во многих продуктах растительного происхождения. Их часто используют в качестве добавок к продуктам питания для увеличения срока годности и придания аромата свежести. Учитывая, что эти соединения могут всасываться клетками кишечника и поступать в системную циркуляцию, важно оценить их влияние на здоровье человека. В данной работе мы оценили потенциальную биологическую активность альдегидов и спиртов с длиной цепи от 6 до 9 углеродов и проверили их провоспалительную активность на экспериментальной системе, основанной на использовании цельной крови доноров. Анализ показал, что девятиуглеродные оксипирины стимулируют выработку провоспалительного цитокина TNF- α (фактор некроза опухоли-альфа), при этом альдегиды активировали синтез TNF- α в меньшей степени, чем спирты. Шести- и восьмиуглеродные оксипирины не проявляли провоспалительную активность. Полученная информация может быть полезна для разработки диетологических рекомендаций для людей, страдающих воспалительными заболеваниями.

Ключевые слова: воспаление, гидропероксидлиаза, оксипирины, фактор некроза опухоли-альфа, цитокины

DOI: 10.31857/S0015330323600948, **EDN:** BJPMSQ

ВВЕДЕНИЕ

Ненасыщенные жирные кислоты в аэробных организмах окисляются спонтанно или ферментативно с образованием оксипиринов — разнообразных соединений, различающихся как по физико-химическим свойствам, так и по биологическим функциям. В растениях ферментативное образование оксипиринов чаще всего инициируется в результате взаимодействия липазы с липидами мембран, что приводит к освобождению поли-

ненасыщенных жирных кислот, главным образом, линолевой и линоленовой. Далее липоксигеназы окисляют свободные жирные кислоты, образуя гидропероксиды, которые могут выступать субстратами для нескольких параллельных ветвей биосинтеза оксипиринов. Растительные липоксигеназы (ЛОГ) по стереоспецифичности делятся на 9- и 13-ЛОГ в зависимости от позиции окисляемого углерода в углеродной цепи жирной кислоты [1, 2]. Примечательно, что субстратами ЛОГ могут выступать не только свободные жирные кислоты, но и жирнокислотные остатки, входящие в состав липидов мембран [3, 4]. Один из путей дальнейшей модификации гидропероксидов жирных кислот — гидропероксидлиазная (ГПЛ) ветвь, ведущая к образованию альдокислот и летучих альдегидов, а также их производных. Как и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600948 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ГПЛ — гидропероксидлиаза, ЛОГ — липоксигеназа, ЛПС — липополисахарид, TNF — фактор некроза опухоли.

ЛОГ, ГПЛ могут использовать в качестве субстрата окисленные жирнокислотные остатки, входящие в состав липидов, что подтверждается тем, что 12-углеродные продукты ГПЛ, связанные с галлактолипидами, были обнаружены в листьях *Arabidopsis thaliana*, капусты, табака, томатов и бобов [5].

ГПЛ относятся к атипичному семейству СУР74 суперсемейства цитохромов Р450 монооксигеназ, которые не нуждаются в НАДФН в качестве донора электронов для ферментативной активности, а используют гидропероксиды жирных кислот и как донор кислорода, и как субстрат [6]. Как и другие СУР74 высших растений, ГПЛ осуществляет гомолитическое расщепление О—О связи гидроперекиси жирной кислоты с образованием алкокси-радикала, который присоединяется к рядом расположенной двойной связи, образуя эпоксиаллильный радикал. Его распад при участии ГПЛ происходит с образованием полуацетала, который спонтанно распадается на альдегид и оксокислоту [7].

При участии 13-ГПЛ из 13-гидропероксида линоленовой кислоты образуются (3Z)-гексеналь и 12-оксо-(9Z)-додеценонная кислота, а из 13-гидропероксида линолевой кислоты вместо (3Z)-гексенала образуется гексеналь [7, 8]. 12-оксо-(9Z)-додеценонная кислота изомеризуется в 12-оксо-(10E)-додеценонную кислоту, именуемую травматином или раневым гормоном. Дальнейшее окисление альдегидной группы приводит к образованию дикарбоновой травматиновой кислоты [9]. В растительных тканях были обнаружены несколько изомеров травматина и травматиновой кислоты и их производные [10]. Активность 13-ГПЛ также, как и 13-ЛОГ, связана с хлоропластами.

Из 9-гидропероксида линолевой и линоленовой кислот образуются летучие (3Z)-ноненаль и (3Z,6Z)-нонадиеналь, соответственно, и нелетучая 9-оксононановая кислота [11, 12]. 9-ЛОГ/9-ГПЛ путь скорее всего функционирует в цитоплазме.

Цис-3-гексеналь и *цис*-3-ноненаль могут быть изомеризованы с участием 3Z:2E-еналь-изомеразы [13, 14]. Шестиуглеродные альдегиды могут быть восстановлены до соответствующего спирта с участием алкогольдегидрогеназы или редуктазы [15, 16]. Известен также фермент, ацетилирующий спирты с формированием соответствующего сложного эфира [17]. Также нельзя исключать возможное окисление ненасыщенных альдегидов и гидрирование двойной связи. Нужно отметить, что каждая из указанных модификаций альдегида приводит к образованию более летучего продукта. Летучие альдегиды и их производные, так называемые “летучие соединения зеленых листьев” (Green Leaf Volatiles), являются основным компонентом аромата зеленых листьев и фруктов.

Из 20-углеродной арахидоновой кислоты, встречающейся у мхов и грибов, формируются

12-гидроперекиси, из которых могут образоваться 8-углеродные летучие соединения такие, как 1-октен-3-ол, а также их ацетилированные производные [18].

ГПЛ довольно широко распространены в природе. Они были обнаружены у многих, хотя и не у всех растений, при этом растения могут содержать как один, так и несколько ферментов, различающихся по специфичности к субстратам и внутриклеточной локализации [19]. Активность ГПЛ, а также продукты ферментативной активности, были обнаружены во многих пищевых и эфиромасличных культурах (табл. 1, Дополнительные материалы). Конститутивная экспрессия генов ГПЛ способствует быстрому образованию и накоплению продуктов ферментативной реакции в растительных тканях после их повреждения.

Биологические функции оксипинов, образующихся в ГПЛ ветви, до конца не понятны. Для некоторых метаболитов ГПЛ ветви показаны антимикробные свойства [20, 21] и продемонстрирована роль в формировании устойчивости растений к насекомым [22, 23]. Накопление в тканях метаболитов ГПЛ ветви в ответ на абиотические стрессы также было описано [24], однако, неизвестно, связано ли их накопление с адаптацией к стрессовым условиям или является результатом повреждения клеточных структур.

Оксипины могут образовываться и в организме человека из полиненасыщенных жирных кислот растительной пищи. Оксипины могут участвовать во множестве физиологических процессов, включая апоптоз, свертывание крови, болевую реакцию и воспаление [25].

Врожденный иммунитет отвечает за раннюю реакцию организма на чужеродный биоматериал. Компоненты бактериальной клеточной стенки, такие как липополисахарид (ЛПС), стимулируют выработку цитокинов моноцитами и макрофагами. Эти цитокины включают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкин (IL)-1 и IL-6, которые способствуют адгезии нейтрофилов и моноцитов в местах инфекции, за которым следует миграция, местное накопление и активация воспалительных клеток. Клетки воспаления неспецифически распознают бактерии и уничтожают их посредством фагоцитоза и/или продукции АФК. Воспалительные цитокины также обеспечивают связь между воспалительными клетками и специфическим иммунитетом, поскольку они могут стимулировать Т- и В-лимфоциты [26]. С учетом активного использования оксипинов в производстве пищи, необходимо исследовать возможную провоспалительную активность этих молекул. Цель работы — исследовать провоспалительную активность оксипинов в экспериментальной системе, основанной на использовании цельной крови доноров.

Таблица 1. Физико-химические свойства молекул оксилипинов и оценка вероятностной биологической активности

Вещество	Молярная масса, г/моль	Растворимость в воде, г/л	Показатель липофильности (lgP)	Площадь полярной поверхности, Å ²	Число вращательных связей	Вероятностная биологическая активность		
						агонист макрофагального колониестимулирующего фактора	противовоспалительная	ингибитор экспрессии TNF-α
3-гексеналь	98.1	5	1.432	17	3	+	—	—
2-гексеналь	98.1	5.3	1.79	17	3	+	—	—
3-гексенол	100.2	16	1.7	20	3	+	—	—
3-гексенилацетат	142.2	0.9	2.415	26	5	+	+	+
Травматиновая кислота	228.3	0.23	2.686	75	10	+	—	+
Октанол	130.2	0.54	3	20	6	+	—	+
1-октенол	128.2	1.84	2.52	20	5	+	—	+
2-ноненаль	140.2	0.093	3.17*	17	6	+	—	—
2-ноненол	142.2	0.62	3.184	20	6	+	—	+
6-ноненаль	140.2	0.2	3.113	17	6	+	—	—
6-ноненол	142.2	0.62	3.014	20	6	+	+	+

Примечание: * — расчетный показатель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали периферическую кровь условно здоровых доноров 23–35 лет. Образцы крови были предоставлены отделением аллергологии и иммунологии Больницы Пущинского научного центра РАН (БПНЦ РАН). Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Информированное согласие было подписано всеми донорами.

Определение содержания цитокинов проводили по описанной ранее методике [27]. К клеткам крови добавляли растительные метаболиты, образующиеся в ГПЛ ветви пути биосинтеза оксилипинов. В качестве позитивного контроля использовали липополисахарид *E. coli* в конечной концентрации 100 нг/мл. Образцы крови инкубировали 6 ч при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе. После инкубации клетки крови осаждали в течение 10 мин при 1000 об/мин на специализированной центрифуге. Полученные супернатанты отбирали и хранили при температуре –20°C. Методом твердофазного иммуноферментного анализа оценивали содержание в сыворотке крови провоспалительного цитокина TNF-α (АО “Вектор-Бест”, Россия).

Методы фармакоинформатики: для получения информации о физико-химических свой-

ствах оксилипинов были использованы ресурсы <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.vcclab.org/lab/alogps> и <http://www.chemspider.com/>. Для поиска возможных клеточных мишеней про- и противовоспалительного действия изучаемых оксилипинов была проведена оценка вероятностного профиля биологической активности данных молекул с помощью веб-ресурса PASS Online (<http://www.way2drug.com/passonline>).

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде медианных значений с квартилями (IQR). Достоверность различий между медианными значениями оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. Различия медианных значений считались достоверными при уровне значимости $P < 0.05$. Для статистического анализа и графического представления данных использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat), STATISTICA 10.1 и SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предсказание биологической активности оксилипинов

Анализ литературных данных и наши собственные исследования показывают, что летучие

метаболиты ГПЛ ветви встречаются во множестве пищевых и эфиромасличных культур, а также в лекарственных растениях (табл. 1, Дополнительные материалы). В табл. 1 представлены основные физико-химические свойства молекул, используемые для предварительной оценки биологической доступности соединений. Показателем липофильности (гидрофобности) служит десятичный логарифм коэффициента распределения (Р) вещества между октанолом и водой. Чем он выше, тем больше накапливается в клеточных мембранах исследуемое вещество, а также тем выше сродство вещества к бычьему сывороточному альбумину [28]. Для большинства лекарственных веществ показатель липофильности находится между -2 и $+5$. Так как показатель липофильности измерен не для всех рассмотренных веществ, для 2-ноненала приводится расчетный показатель липофильности по ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Inc.). Площадь полярной поверхности вычисляется как площадь участка молекулы, занимаемая электроотрицательными гетероатомами (O, N, S, P) и связанными с ними атомами водорода. Показано, что для пассивной диффузии сквозь мембраны нужно, чтобы площадь полярной поверхности была не более $140 \text{ \AA}^2$ [29]. Число связей, вокруг которых возможно свободное вращение частей молекулы, служит мерой ее конформационной изменчивости. Большая конформационная изменчивость препятствует диффузии сквозь мембрану и совмещению молекулы с ее мишенью, поэтому считается, что число вращательных связей должно быть не более 10 [29]. У всех исследованных нами веществ величины рассмотренных показателей находятся в пределах, благоприятствующих биологической доступности.

Предсказание биологической активности веществ в PASS Online основано на анализе взаимосвязей структура-активность для обширной обучающей выборки, включающей в себя: субстанции лекарственных препаратов; “кандидаты в препараты”, находящиеся на различных стадиях клинических и доклинических исследований; фармакологические вещества и биохимические реагенты, зонды; вещества, для которых имеется информация о специфической токсичности. Был получен список прогнозируемых типов активности с оценками вероятности наличия каждого вида активности (P_a) и вероятности отсутствия каждого вида активности (P_i). Чем больше для конкретной активности значение P_a , и чем меньше значение P_i , тем больше шанс обнаружить данную активность в эксперименте [30].

Нами были отобраны активности с $P_a > 0.5$. Для всех исследуемых оксипинов была предсказана агонистическая активность по отношению к макрофагальному колониестимулирующему фактору, цитокину, который стимулирует генера-

цию подмножеств миелоидных клеток, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки в ответ на стресс, инфекции и раковые заболевания (табл. 1) [31]. Согласно предсказанию, противовоспалительной активностью обладают 3-гексенил-ацетат и 6-ноненол. Показана возможная активность ингибирования экспрессии TNF- α для 3-гексенил-ацетата, октанола, 1-октанола, 6-ноненола и 2-ноненола, а также травминовой кислоты.

Исследование провоспалительной активности оксипинов

Нами была использована экспериментальная система, основанная на использовании цельной крови доноров, для оценки влияния оксипинов на индукцию воспалительных ответов. Конечная концентрация оксипинов в анализируемых образцах составляла 100 мкМ. У большинства шести- и восьмиуглеродных оксипинов не обнаружена провоспалительная активность, так как различия с контролем не достигали статистической значимости (рис. 1).

Заметная наработка провоспалительного цитокина TNF- α наблюдалась в образцах с девятиуглеродными оксипинами (рис. 1). Ответ клеток доноров на активацию этими оксипинами варьировался в широких пределах, что указывает на важную роль других факторов крови в активации провоспалительного ответа на используемые оксипины. Уровень TNF- α был немного выше при использовании спиртов, чем соответствующих альдегидов.

Для выяснения концентрационной зависимости наблюдаемого эффекта мы изучили влияние различных концентраций 6-ноненала на индукцию синтеза TNF- α в экспериментальной системе. В качестве позитивного контроля был выбран широко известный активатор воспалительного ответа — эндотоксин (липополисахарид, ЛПС) из *E. coli*. Результаты представлены на рис. 2.

При активации клеток крови очень низкой и высокой концентрациями 6-ноненала наблюдалась наименьшая провоспалительная активность. Концентрация 10 мкМ индуцировала наибольший синтез TNF- α , хотя и наблюдалась значительная индивидуальная вариативность, и различия в эффектах разных концентраций в большинстве случаев были статистически незначимы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологическая активность растительных оксипинов, в том числе метаболитов ГПЛ ветви, в животной клетке была продемонстрирована во множестве работ, подробный обзор которых был опубликован недавно [32]. Среди метаболитов ГПЛ ветви внимание уделялось лишь нелету-

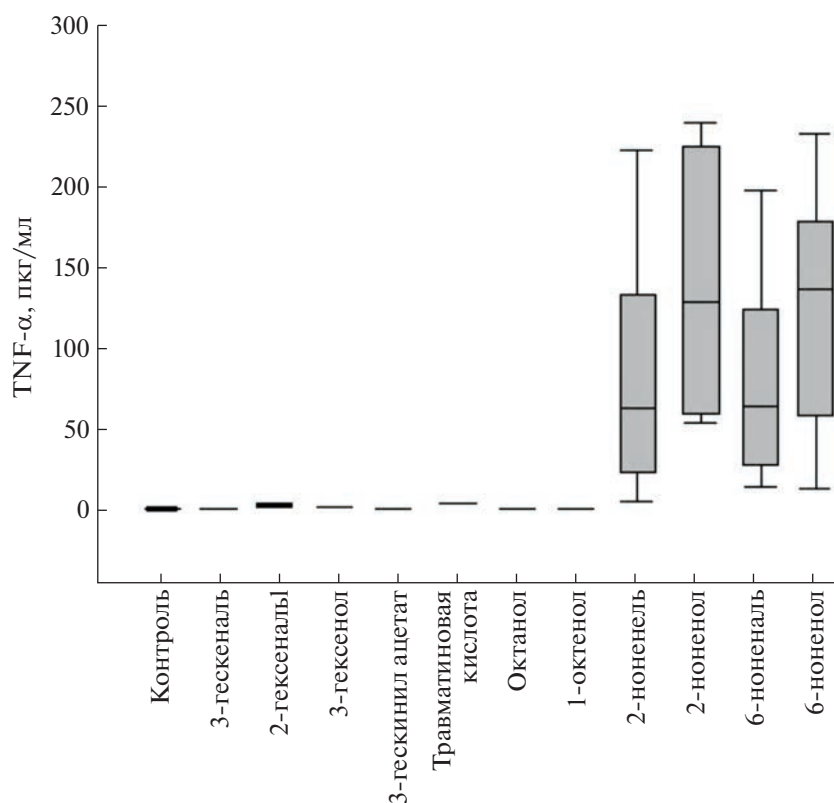


Рис. 1. Изменение синтеза TNF- α клетками крови здоровых доноров в ответ на оксилпины. $n = 3-12$.

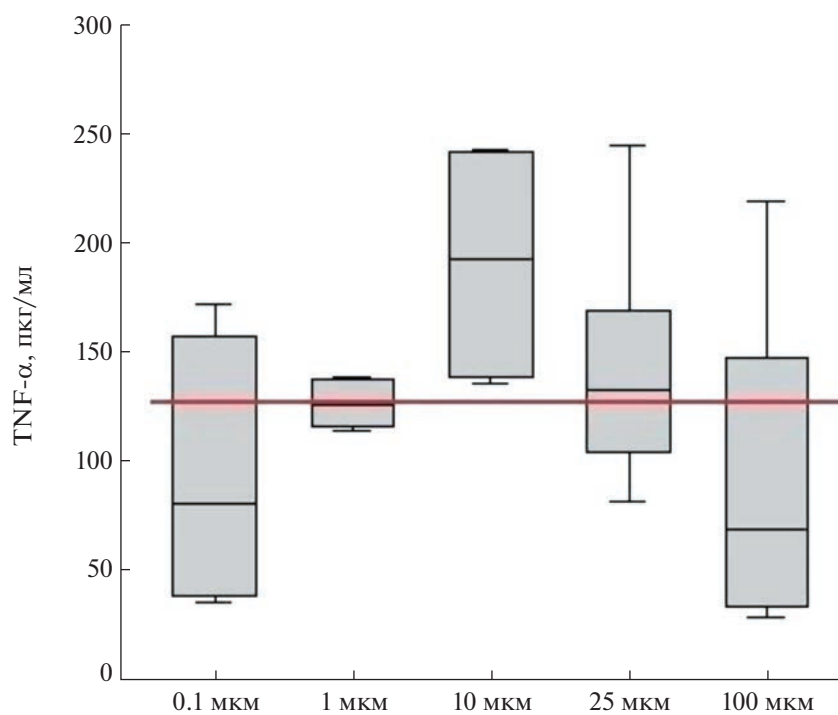


Рис. 2. Изменение синтеза TNF- α клетками крови здоровых доноров в ответ на различные концентрации 6-ноненала. $n = 4-8$. Чертой обозначено среднее значение ответа на липополисахарид *E. coli*.

чей травминовой кислоты. Однако, именно летучие альдегиды и их производные широко используются в пищевой промышленности для придания аромата свежести продуктам и для увеличения их сохранности [33–35]. До настоящего времени их влияние на здоровье человека мало изучено. Вместе с растительной пищей мы потребляем значительное количество альдегидов и спиртов с длиной цепи от 6 до 9 углеродов и их производных, образующихся в ГПЛ ветви пути биосинтеза оксипинов (табл. 1, Дополнительные материалы). Поглощенные с пищей оксипины могут не только воздействовать на клетки кишечника, но также всасываться и циркулировать в плазме крови [36–38]. Поэтому важно оценить влияние этих соединений на здоровье человека. В литературе активно обсуждается способность растительных экстрактов и содержащихся в них оксипинов регулировать иммунную активность клеток крови человека [39, 40]. Несмотря на обнаруженную противовоспалительную активность нескольких оксипинов, в ряде работ показаны провоспалительные свойства полиненасыщенных ω -6 жирных кислот, из которых образуются оксипины [26].

Мы рассмотрели основные физико-химические свойства изучаемых веществ, используемые для предварительной оценки биологической доступности предполагаемых лекарств [28], для того, чтобы выявить возможную связь между химическим строением и биологической активностью исследуемых веществ. У всех веществ величины рассмотренных показателей находятся в пределах, благоприятствующих биологической доступности (табл. 1). Девятиуглеродные спирты и альдегиды отличаются повышенной липофильностью, а следовательно их действие на физиологический процесс может обуславливаться накоплением в липидных мембранах или связыванием с белками плазмы. Именно эти соединения проявили активность в использованной нами экспериментальной системе.

По результатам поиска возможных клеточных мишеней про- и противовоспалительного действия изучаемых оксипинов, спрогнозированный спектр активности получился достаточно обширным. Возможно, в структуре этих довольно простых веществ не содержится каких-либо особенностей, обеспечивающих высокую селективность их биологического действия. Вероятность Ра отражает прежде всего сходство структуры молекул данного вещества со структурами молекул наиболее типичных в соответствующем подмножестве “активных” веществ в обучающей выборке. Поэтому никакой прямой корреляции значений Ра с количественными характеристиками активности, как правило, нет [30]. К результатам такого прогноза необходимо относиться с большой осторожностью.

Шестиуглеродные оксипины часто встречаются в пищевых продуктах (см. табл. 1, Дополнительные материалы). Экспериментальная оценка их провоспалительной активности показала, что они не активируют клетки крови к выработке значительного количества провоспалительного цитокина TNF- α , тогда как девятиуглеродные оксипины являются в значительной степени иммуногенными. При попадании в кровь девятиуглеродные оксипины индуцируют значительную выработку провоспалительного цитокина TNF- α , тем самым запуская возможное развитие воспалительного ответа. Девятиуглеродные альдегиды активировали синтез TNF- α в меньшей степени, чем спирты. В парах 6-ноненол/2-ноненаль и 6-ноненаль/2-ноненаль провоспалительная активность очень близка, что свидетельствует о том, что положение двойной связи в молекуле не сказывается на его провоспалительных свойствах. Результаты показывают, что для проявления иммуномодулирующей активности оксипина имеет значение как длина углеродной цепи, так и наличие функциональной группы (гидроксильная или альдегидная). Девятиуглеродные оксипины были обнаружены в огурце, арбузе, семенах миндаля и некоторых лекарственных растениях. Данные о провоспалительной активности этих соединений, полученные в нашей работе, могут быть полезны для разработки диетологических рекомендаций для людей, страдающих воспалительными заболеваниями.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 22-24-00489.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liavonchanka A., Feussner I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. P. 348.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.006>
2. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases - structure and reaction mechanism // Phytochem. 2009. V. 70. P. 1504.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.008>
3. Brash A.R., Ingram C.D., Harris T.M. Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 5465.
<https://doi.org/10.1021/bi00391a038>
4. Leon J., Royo J., Vancanneyt G., Sanz C., Silkowski H., Griffiths G., Sanchez-Serrano J.J. Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 416.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M107763200>
5. Nakashima A., von Reuss S.H., Tasaka H., Nomura M., Mochizuki S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Boland W.,

- Takabayashi J., Matsui K.* Traumatins- and Dinortraumatins-containing Galactolipids in Arabidopsis: their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 26078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487959>
6. *Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S.* Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes // *Nature*. 2008. V. 455. P. 363. <https://doi.org/10.1038/nature07307>
 7. *Grechkin A.N., Hamberg M.* The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1636. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2003.12.003>
 8. *Matsui K., Kurishita S., Hisamitsu A., Kajiura T.* A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation // *Biochem. Soc. Trans.* 2000. V. 28. P. 857.
 9. *Zimmerman D.C., Coudron C.A.* Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid // *Plant Physiol.* 1979. V. 63. P. 536. <https://doi.org/10.1104/pp.63.3.536>
 10. *Kallenbach G., Gildardi P.A., Allmann S., Baldwin I.T., Bonaventure G.* C12 derivatives of the hydroperoxide lyase pathway are produced by product recycling through lipoxygenase-2 in *Nicotiana attenuata* leaves // *New Phytol.* 2011. V. 191. P. 1054. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03767.x>
 11. *Stumpe M., Bode J., Göbel C., Wichard T., Schaaf A., Frank W., Frank M., Reski R., Pohnert G., Feussner I.* Biosynthesis of C9-aldehydes in the moss *Physcomitrella patens* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1761. P. 301. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.03.008>
 12. *Tijet N., Schneider C., Muller B.L., Brash A.R.* Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids // *Arch Biochem Biophys.* 2001. V. 386. P. 281. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2218>
 13. *Noordermeer M.A., Veldink G.A., Vliegthart J.F.G.* Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase // *FEBS Lett.* 1999. V. 443. P. 201. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01706-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01706-2)
 14. *Kunishima M., Yamauchi Y., Mizutani M., Kuse M., Takikawa H., Sugimoto Y.* Identification of (Z)-3-(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 14023. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726687>
 15. *Bate N.J., Riley J.C.M., Thompson J.E., Rothstein S.J.* Quantitative and qualitative differences in C6-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Physiol. Plant.* 1998. V. 104. P. 97. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040113.x>
 16. *Tanaka T., Ikeda A., Shiojiri K., Ozawa R., Shiki K., Nagai-Kunihiro N., Fujita K., Sugimoto K., Yamato K.T., Dohra H., Ohnishi T., Koeduka T., Matsui K.* Identification of a hexenal reductase that modulates the composition of green leaf volatiles // *Plant Physiol.* 2018. V. 178. P. 552. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00632>
 17. *D'Auria J.C., Pichersky E., Schaub A., Hansel A., Gershenzon J.* Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02946.x>
 18. *Kihara H., Tanaka M., Yamato K.T., Horibata A., Yamada A., Kita S., Ishizaki K., Kajikawa M., Fukuzawa H., Kohchi T., Akakabe Y., Matsui K.* Arachidonic acid-dependent carbon-eight volatile synthesis from wounded liverwort (*Marchantia polymorpha*) // *Phytochemistry*. 2014. V. 107. P. 42. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.008>
 19. *Noordermeer M.A., Van Dijken A.J., Smeekens S.C., Veldink G.A., Vliegthart J.F.* Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 2473. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01283.x>
 20. *Matsui K., Minami A., Hornung E., Shibata H., Kishimoto K., Ahnert V., Kindl H., Kajiura T., Feussner I.* Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 649. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.006>
 21. *Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., Rodriguez M.J., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerré-Tugayé M.-Th., Rosahl S., Castresana C., Hamberg M., Fournier J.* Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens // *Plant Physiol.* 2005. V. 139. P. 1902. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066274>
 22. *Matsui K.* Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 274. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.002>
 23. *Savchenko T., Pearse I.S., Ignatia L., Karban R., Dehesh K.* Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 653. <https://doi.org/10.1111/tpj.12064>
 24. *Loreto F., Barta C., Brilli F., Nogues I.* On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature // *Plant Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01561.x>
 25. *Шупелин В.А., Сидорова Ю.С.* Оксипилены — биологически активные вещества пищи // *Вопросы питания*. 2020. Т. 89. С. 16. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10073>
 26. *Thies F., Miles E.A., Nebe-von-Caron G., Powell J.R., Hurst T.L., Newsholme E.A., Calder P.C.* Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults // *Lipids*. 2001. V. 36. P. 1183. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0831-4>
 27. *Radzyukevich Y.V., Kosyakova N.I., Prokhorenko I.R.* Synergistic effect of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen and *Escherichia coli* lipopolysaccharide on hu-

- man blood cells // PloS One. 2018. V. 13:e0207311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207311>
28. Barret R. Medicinal Chemistry: fundamentals. Elsevier. 2018. 172 p.
 29. Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.-Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates // J. Med. Chem. 2002. V. 45. P. 2615. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
 30. Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глориозова Т.А., Рудик А.В., Дружиловский Д.С., Погодин П.В., Поройко В.В. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS ONLINE // Химия гетероциклических соединений. 2014. Т. 3. С. 483.
 31. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: a double-edged sword in cancer immunotherapy // Front. Immunol. 2022. V. 13. P. 901277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901277>
 32. Savchenko T., Degtyaryov E., Radzyukevich Y., Buryak V. Therapeutic potential of plant oxylipins // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 14627. <https://doi.org/10.3390/ijms232314627>
 33. Lehtonen M., Kekäläinen S., Nikkilä I., Kilpeläinen P., Tenkanen M., Mikkonen K.S. Active food packaging through controlled in situ production and release of hexanal // Food Chem.: X. 2020. V. 5. P. 100074. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100074>
 34. Mussinan C.J., Mookherjee B.D., Vock M.H., Schmitt F.L., Granda E.J., Vinals J.F., Kiwala J. Flavoring with a mixture of *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal, *cis*-3-hexenyl formate, *cis*-3-hexenol and *cis*-3-hexenyl-*cis*-3-hexenoate. US Patent № 4241098. 1979.
 35. Vincenti S., Mariani M., Alberti J.-C., Jacopini S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Berti L., Maury J. Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxygenase metabolic pathway // Catalysts. 2019. V. 9. P. 873. <https://doi.org/10.3390/catal9100873>
 36. Karg K., Dirsch V.M., Vollmar A.M., Cracowski J.L., Laporte F., Mueller M.J. Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition // Free Radic. Res. 2007. V. 41. P. 25. <https://doi.org/10.1080/10715760600939734>
 37. Larsson K., Harrysson H., Havenaar R., Alming M., Undeland I. Formation of malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in fish and fish oil during dynamic gastrointestinal *in vitro* digestion // Food Funct. 2016. V. 7. P. 1176. <https://doi.org/10.1039/c5fo01401h>
 38. Goicoechea E., Brandon E.F., Blokland M.H., Guillén M.D. Fate in digestion *in vitro* of several food components, including some toxic compounds coming from omega-3 and omega-6 lipids // Food Chem. Toxicol. 2011. V. 49. P. 115. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.005>
 39. Salem M.L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed // Int. Immunopharmacol. 2005. V. 5. P. 1749. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.06.008>
 40. Block K.I., Mead M.N. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review // Integr. Cancer Ther. 2003. V. 2. P. 247. <https://doi.org/10.1177/1534735403256419>

УДК 581.1

ПРИМЕНЕНИЕ *in silico* АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

© 2023 г. К. В. Малахова^а, Д. Н. Зонтиков^а, А. И. Щербакова^б, Р. В. Сергеев^{б, *}^аКостромской государственный университет, Кострома, Россия^бПоволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия

*e-mail: sergeevphd@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.12.2021 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

В работе предложен и апробирован новый подход оптимизации биотехнологических процессов, в том числе процесса микроклонального размножения. Предлагаемый метод основан на построении карты подобия структур молекул вторичных метаболитов растительных экстрактов и молекул – регуляторов процессов морфогенеза растений (прежде всего фитогормонов) с последующим прогнозированием действия экстракта. В качестве примера был использован экстракт лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach. (Parmeliaceae), для которого хорошо известен спектр содержащихся вторичных метаболитов. Выявлено структурное сходство алифатических вторичных соединений лишайника (протолихестериновая и лихестериновая кислоты) со стриголактонами (в большей степени), а также с гиббереллинами и брассиностероидами. На основе анализа полученных результатов был сделан прогноз о дозозависимом воздействии экстракта лишайника *C. islandica* на ростовые процессы и ризогенез микропобегов *in vitro*. Эта гипотеза была экспериментально проверена в экспериментах при микроклональном размножении высших растений *Lonicera caerulea* L. и *Populus tremula* L. В результате проведенных работ установлено, что добавление экстракта из *C. islandica* в концентрации 10–50 мг/л в состав питательной среды увеличивало коэффициент размножения *L. caerulea* (на 31%) и *P. tremula* (на 8%). Экспериментально доказана ризогенная активность экстракта лишайника в тех же концентрациях (10–50 мг/л среды), схожая с активностью стриголактонов и гиббереллинов. Также показано положительное влияние экстракта *C. islandica* (50 мг/л) на элонгацию микропобегов обеих культур и геммогенез *P. tremula*. Предложенный подход позволяет оптимизировать исследования, направленные на выявление эффекта различных экстрактов на морфогенез растений *in vitro* путем предварительного построения карты подобия содержащихся в экстрактах вторичных метаболитов (в том числе по данным литературы) и известных регуляторов роста (в том числе фитогормонов) с последующим прогнозированием действия экстракта.

Ключевые слова: *Cetraria islandica*, *Lonicera caerulea*, *Populus tremula*, брассиностероиды, вторичные метаболиты, гиббереллины, клональное микроразмножение, лихестериновая кислота, протолихестериновая кислота, ризогенез, стриголактоны, эпигейные лишайники, *in silico*

DOI: 10.31857/S0015330321100766, EDN: CVQBLU

ВВЕДЕНИЕ

Рост и развитие растений регулируют различные вещества: гормоны и соединения негормональной природы. Основные группы таких веществ и физиология их действия уже давно описаны в литературе. На заре развития биотехнологии и культуры растительных клеток, в частности, исследователи зачастую сначала добавляли в среду культивирования тот или иной компонент, а лишь потом определяли его действие на морфогенез. Однако в ряде случаев существует необходимость в знаниях о том, как те или иные вещества биологического синтеза могут влиять на рост и развитие отдельных растительных объектов. Методы,

которые помогают предсказать механизм действия вещества, исходя из химической структуры, это быстрый, удобный и недорогой инструмент в исследованиях физиологии растений. Почти все модели *in silico* сегодня используют уже накопленную информацию о веществах и их токсичности из существующих баз данных [1].

Лишайники (лихенезированные грибы) являются мультикомпонентным организмом, состоящим из микобионта (гриб) и фотобионта (водоросль и/или цианобактерия). Благодаря данному взаимодействию, лишайники выжили на протяжении миллионов лет в экстремальных условиях [2]. Занимая 8% суши [3], они сосуществуют с другими организмами, включая высшие расте-

ния, и данные взаимодействия исследованы недостаточно. *Cetraria islandica* (L.) Ach. широко распространен по всему миру, в том числе почти на всей территории РФ за исключением степей и пустынь [4].

В качестве вторичных метаболитов ацетонового экстракта из *C. islandica* ранее были описаны протоцеттаровая, сукцинпротоцеттаровая, фумарпротоцеттаровая, виренсиновая, нефростериновая, протолихестериновая, лихестериновая и рокцелларовая кислоты [5].

Известно, что наиболее изученный вторичный метаболит лишайников — усниновая кислота, обладает антимикробными свойствами в отношении грамположительных бактерий, микобактерий, грибов, простейших, вирусов и водорослей [6–8]. Также проводятся исследования цитотоксических свойств усниновой кислоты и других метаболитов (более 20) различных лишайников на раковых клетках человека [8]. Но влияние экстрактов лишайников на высшие растения изучено недостаточно, несмотря на то, что исследования в данном направлении имеют фундаментальное значение, способное пролить свет на особенности межорганизменного взаимодействия лишайнизированных грибов, как сложной многокомпонентной системы с окружающей их природной средой [9].

Основная масса исследований посвящена влиянию лишь усниновой кислоты на высшие растения, в частности на особенности транспираторной и фотосинтетической функций растений, в то время как остальные метаболиты остались не исследованы. В работе Лузиной с соавт., описано влияние усниновой кислоты на витальность и активность ростовых процессов высших растений различных семейств: сосновые, злаковые, крестоцветные, луковые, пасленовые и др. [9]. При этом спектр исследований по данному соединению охватывал изучение влияния усниновой кислоты на рост и развитие высших растений, преимущественно сельскохозяйственных и хозяйственно-ценных культур, на различных стадиях онтогенеза: от проращивания семян до роста генеративных побегов. Во многих работах отмечается ингибирующее действие усниновой кислоты: на прорастание семян табака (*Nicotiana tabacum* L.) [10], на ростовые процессы иматурных особей томата (*Lycopersi conesculentum* Mill.) [11, 12] и шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.) [13], на ризогенез проростков кукурузы (*Zea mays* L.) и подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) [14]. Также сообщается об угнетающем действии усниновой кислоты на древесные растения: дуб круглолистный (*Quercus rotundifolia* Lam.) [15] и иву прелестную (*Salix blanda* And.) [16]. Не исследованным остается вопрос об аллелопатическом воздействии других вторичных метаболитов и многокомпонентных экстрак-

тов лишайников на ростовые процессы и ризогенез высших растений. Экстракты лишайников, как и экстракты высших растений вероятно могут обладать синергетическим эффектом взаимодействия входящих в их состав соединений и влиять на физиологические процессы покрытосеменных растений.

Исследования, направленные на моделирование и экспериментальное подтверждение биологической активности вторичных метаболитов биологических объектов и в частности лишайников, открывают новые возможности для многостороннего их применения в различных сферах хозяйственной деятельности человека.

Таким образом, целью исследования было проведение *in silico* анализа вторичных метаболитов ацетонового экстракта из лишайника *C. islandica* и изучение его влияния на морфогенные процессы высших растений в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

***In silico* анализ регуляторной способности вторичных метаболитов из *C. islandica* с использованием карты подобия.** Для определения возможного кандидата, среди известных вторичных метаболитов лишайника *C. islandica*, влияющего на морфогенез высших растений, был проведен их сравнительный анализ со структурами известных фитогормонов (базы данных ChEMBL Database (ebi.ac.uk) и National Center for Biotechnology Information (nih.gov)) с использованием метода Стохастического вложения соседей с *t*-распределением (*t*-distributed Stochastic Neighbor Embedding, *t*-SNE), что является алгоритмом машинного обучения [17]. Структурные формулы были разбиты на, так называемые, кор-фрагменты (Core-Fragment) и радикалы. На основе полученных кор-фрагментов и алгоритма, включающего в себя дескриптор отпечатков (FragFp), была построена карта распределения молекул согласно их схожести. Максимально схожие молекулы (более 80%, $\text{FragFp} > 0.8$) были объединены в кластеры.

Получение экстракта. Таллом лишайника *C. islandica* (рис. 1) был собран в различных участках сосняка-беломошника Красносельского района Костромской области. Очищенные и высушенные в сушильном шкафу (50°C, 4 ч) талломы лишайника массой воздушно-сухого сырья 20.0053 г подвергали экстрагированию в кипящем ацетоне 99.5% объемом 500 мл в течение 40 мин [18]. Экстрагирование в ацетоне позволяет извлечь широкий спектр вторичных метаболитов. Экстракт фильтровали и упаривали до объема 20 мл. Осаждение вторичных метаболитов осуществляли этиловым спиртом (добавляемый объем 15 мл). После чего экстракт помещали в холодильный шкаф (“Атлант” 4009–000, Беларусь) (5°C, 72 ч).



Рис. 1. *Cetraria islandica* (L.) Ach.

Затем осадок концентрировали на центрифуге MINISPIN (“EPPENDORF”, Германия) в микропробирках Эппендорф на 1.5 мл при 13000 об./мин. в течение 40 с, надосадочную жидкость сливали, осадок высушивали в сушильном лабораторном шкафу ШС-80-01 (СКТБ СПУ, Россия) (80°C, 4 ч).

Растительный материал. В качестве модельных объектов исследования использовали растительный материал в культуре *in vitro* осины триплоидной (*Populus tremula* L.) и жимолости синей (*Lonicera caerulea* L.) сорта “Бакчарская”. Данные виды являются наиболее удобными модельными объектами для исследования воздействия экстракта *C. islandica* ввиду интенсивности роста микропобегов на этапе клонального микроразмножения на апробированных нами питательных средах и скорости корнеобразования на этапе укоренения. Кроме того, данные виды принадлежат к категории хозяйственно ценных и ягодных культур, что определяет ценность оптимизации условий их размножения и культивирования для дальнейшего плантационного выращивания.

Исследование влияния экстракта на морфогенетические процессы растений. Исследование влияния экстракта лишайников на морфогенез высших растений осуществляли с использованием культуры *in vitro*. В качестве контроля использовали апробированный состав агаризованной питательной среды по прописи МС-среда [19]. При культивировании в условиях *in vitro* стерильных микрочеренков *P. tremula* в среду добавляли

0.05 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты (“Sigma-Aldrich”, США), а при культивировании *L. caerulea* 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) (“БиолоТ”, РФ). В исследуемые варианты питательных сред был добавлен экстракт лишайника *C. islandica* в концентрациях 10, 50 и 500 мг на литр питательной среды (мг/л). Растения-регенеранты культивировали в конических стеклянных сосудах объемом 250 мл. В каждом сосуде было 30 мл питательной среды и по 30 растений. Морфогенную активность микропобегов (длина микропобега, количество узлов, коэффициент размножения, начало ризогенеза, количество укорененных микропобегов и длину корней) оценивали на 35 сут культивирования.

Все эксперименты проводили в 3 повторностях. Статистическая обработка данных была проведена в Microsoft Excel с использованием пакета “Анализ данных”. Данные представлены в виде среднего арифметического $\pm$ ошибка среднего (SEM). Значимость различий была определена с использованием *t*-критерия Стьюдента, при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность некоторых вторичных метаболитов *C. islandica*. Сравнительный анализ известных вторичных метаболитов ацетонового экстракта из *C. islandica* [5] показал, что только вторичные алифатические соединения (протолихестериновая и

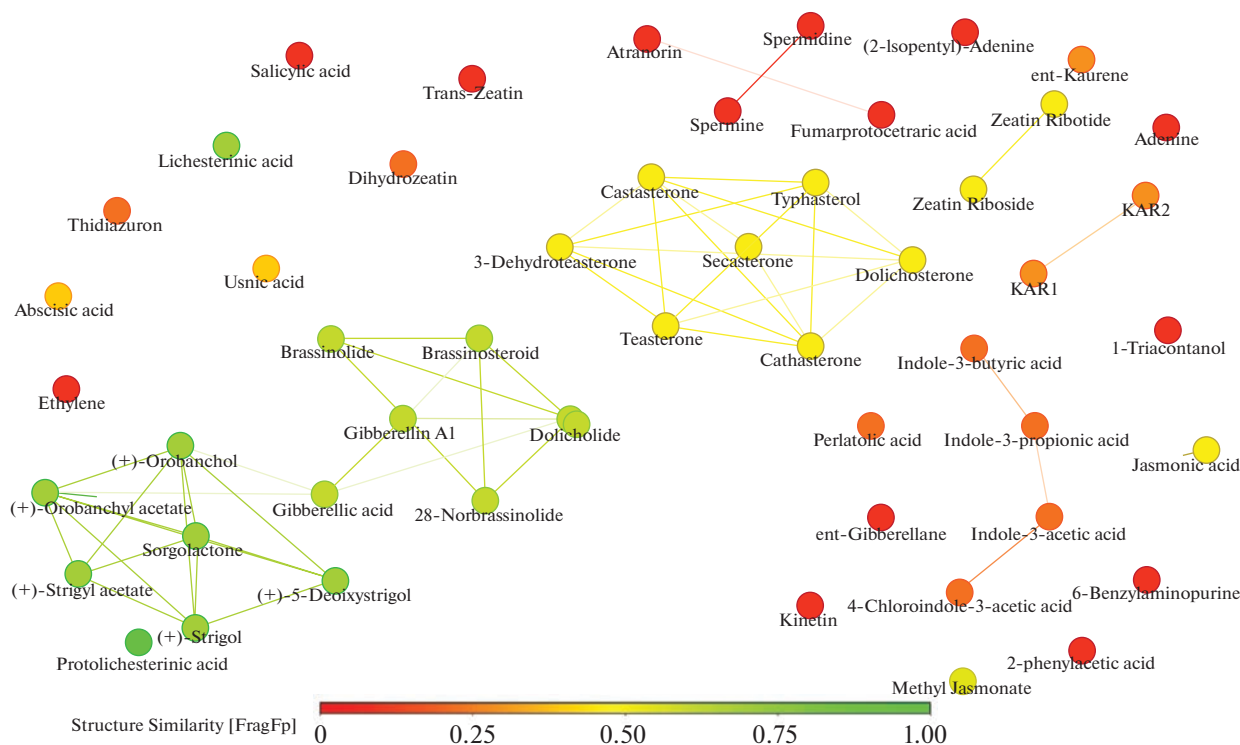


Рис. 2. Карта подобия структур молекул вторичных метаболитов лишайников *C. islandica* и молекул фитогормонов. Цвет от красного к зеленому обозначает процент схожести: от 0 до 100%. Вещества со структурным подобием более 80% (FragFp > 0.8) объединены в кластеры.

лихестериновой кислоты) по своей структуре схожи с фитогормонами (окрашены в зеленый) (рис. 2).

Карта подобия отображает положение молекул в зависимости от их схожести: вещества, отличающиеся по структуре, были распределены на максимально дальнее расстояние, в то время как похожие вещества были сконцентрированы. Алгоритм программы выявляет родственные между собой вещества и определяет их в кластеры (объединены линиями). Окрашивание точек на карте определяет процент схожести структурных формул веществ: от красного — схожести не наблюдалось (FragFp = 0); до зеленого — 100% схожесть (FragFp = 1). Данный анализ позволяет выдвинуть гипотезу о возможном влиянии каждого метаболита *C. islandica* в зависимости от их структурного подобия тем или иным фитогормонам.

Среди вторичных метаболитов лишайника *C. islandica*, описанных в литературе, лихестериновая и протолихестериновая кислоты показали наибольшую схожесть с стриголактонами, меньшую — с гиббереллинами и еще меньшую с брассиностероидами (рис. 3). Из рис. 3 видно, что фумарпропостетраровая кислота, перлатоловая кислота и атранорин по структуре схожи между собой, но отличаются от представленных фитогормонов с процентом схожести ниже 50.

Как известно, содержание протолихестериновой кислоты в *C. islandica* составляет от 0.1 до 1.5%

сухой массы лишайника (в зависимости от места сбора) [20].

Ранее Ingolfssdottir К. с соавт., было показано, что экстракт петролейного эфира из *C. islandica* полученный через 30 мин экстрагирования содержит примерно 0.03% протолихестериновой кислоты (111 мкг протолихестериновой кислоты в 397 мг полного экстракта) [20]. Активная концентрация ацетонового экстракта из *C. islandica* равная 50 мг/л может быть эквивалентна концентрации протолихестериновой кислоты равной 0.015 мкг/л.

Стриголактоны представляют собой небольшую группу соединений, производных каротиноидов, выделяемых из корней 80% наземных растений и обеспечивающих симбиотическую связь с почвенной арбускулярной микоризой [21]. Стриголактоны широко участвуют в регулировании роста корней, архитектуры побегов, старения листьев, клубеньков и взаимодействия бобовых и симбионтов, а также в ответе на различные внешние раздражители, такие как абиотические и биотические стрессы [22, 23]. Эти функциональные свойства стриголактонов нашли широкое применение в генной инженерии сельскохозяйственных культур с целью улучшения продуктивности растений и увеличения урожая [23].

Гиббереллины участвуют в регуляции ростовых процессов клеток, что проявляется в удлинении

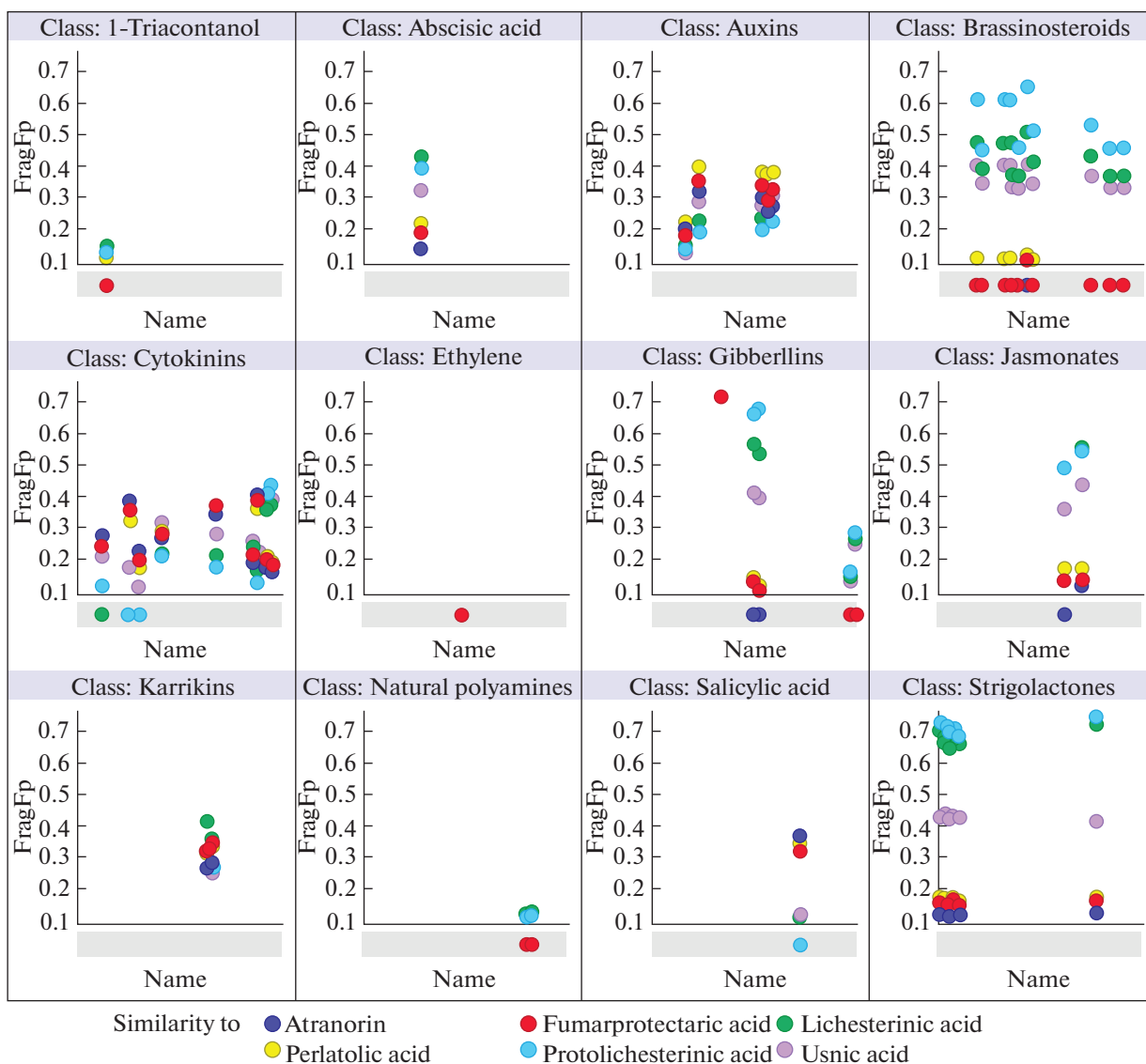


Рис. 3. Графики распределения значений схожести вторичных метаболитов из лишайника *C. islandica* с фитогормонами в зависимости от их класса (представители разных классов отражены на отдельном графике). По оси абсцисс каждого графика расположены фитогормоны, по оси ординат – значения FragFp.

нии стебля, корней и развивающихся органов цветков [24]. Высокая схожесть лихестериновой и протолихестериновой кислот, являющихся вторичными метаболитами лишайников *C. islandica*, со стриголактонами и гиббереллинами может объяснить стимулирование ризогенеза у объектов исследования. Как известно, концентрация многих фитогормонов при низких концентрациях является стимулирующей, но при повышении концентраций они подавляют рост растений. В нашем случае мы наблюдали данный эффект при повышении концентрации до 500 мг/л.

Анализируя опубликованные данные [25, 26] было обнаружено, что стриголактон GR24 оказал положительное влияние на прорастание семян

Pinguicula ramosa в концентрации 3 нМ ($= 0.895 \times 10^3$ мг/л), при концентрации 3–30 мкМ ($= 0.895$ мг/л – 8.949 мг/л) данный фитогормон ингибировал рост первичного корня [26]. Другие стриголактоны – стригол и оробанчол, индуцировали прорастание семян *Orobancheminor* при концентрации 0.001 мкМ ($= 0.35 \times 10^3$ мг/л) (ChEMBL3045114). Концентрация гиббереллинов, необходимая для прорастания семян, значительно выше необходимой концентрации стриголактонов. Например, было опубликовано, что концентрация гиббереллинов необходимая для прорастания семян *Cyclamen* составила 50 мг/л [27]. В отношении *Lactuca sativa* гиббереллин (+)-гиббереллиновая кислота продемонстриро-

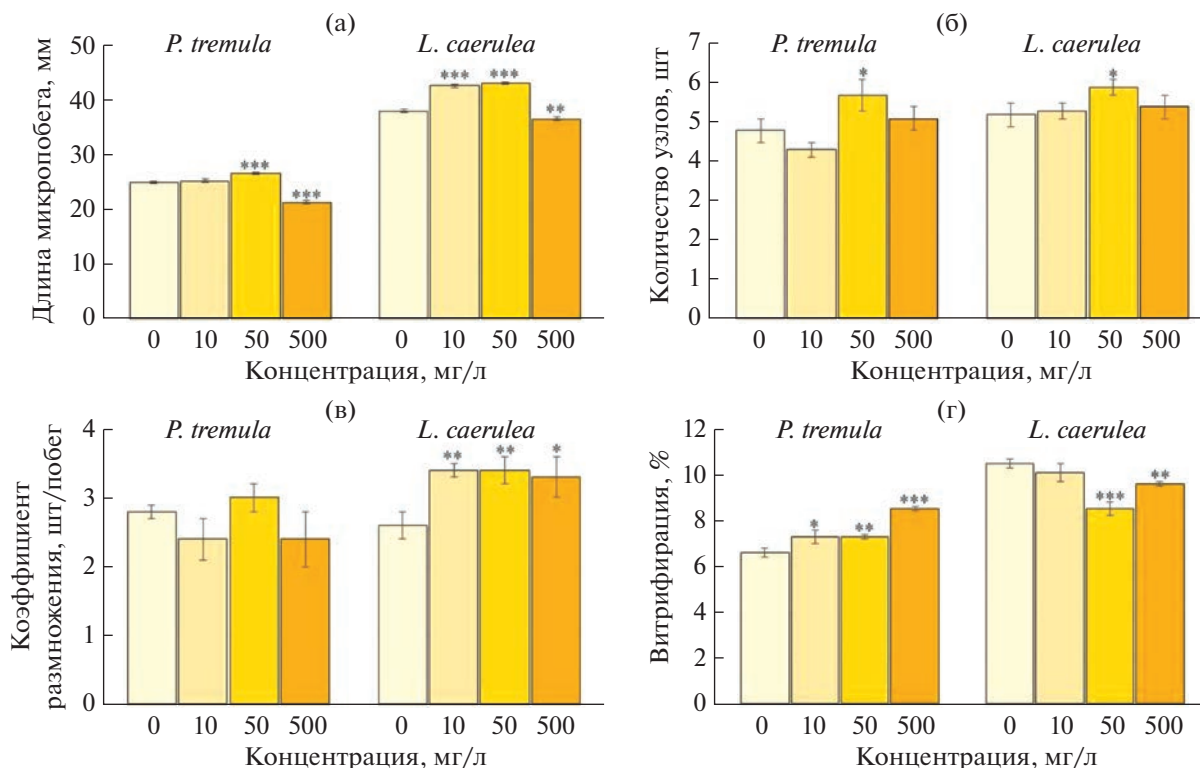


Рис. 4. Влияние экстракта из лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach на витальность и морфогенную активность микропобегов 1 – *P. tremula* и 2 – *L. caerulea* в культуре *in vitro*: а) на длину микропобега; б) на количество узлов; в) на коэффициент размножения; г) на вирификацию. * – при $P < 0.05$; ** – при $P < 0.01$; *** – при $P < 0.001$.

вала ингибирующее действие на прорастание семян при концентрации 1 мМ (= 350 мг/л) (ChEMBL3046139).

Концентрация протолихестериновой кислоты, выше рассчитанная по опубликованным данным [21] лежит в диапазоне активных концентраций для стриголактонов. Таким образом, можно выдвинуть гипотезу, что протолихестериновая кислота (одна или в комбинации с другими компонентами экстракта) является компонентом ингибирующим ризогенез.

Брассиностероиды представляют собой группу стероидных гормонов, играющих важную роль в физиологии развития и роста растений. Передача сигналов брассиностероидов способствует делению клеток, а также играет роль в этиологии. Недавние исследования показали, что брассиностероиды участвуют в процессе образования цветков, формирования архитектуры соцветий и других аспектах репродуктивных процессов растений [28].

Экстрагирование. Количественное содержание ацетонового экстракта из *C. islandica* составляло 2.1–5.2 мг/г воздушно-сухого сырья. На основе опубликованных научных данных можно заключить, что ацетоновый экстракт из *C. islandica* содержит протоцеттаровую, сукцинпротоцеттаро-

вую, фумарпротоцеттаровую, виренсиновую, нефростериновую, протолихестериновую, лихестериновую и рокцеляровую кислоты [5].

Влияние экстракта из *C. islandica* на морфогенез *P. tremula* и *L. caerulea*. В рамках данного исследования было изучено воздействие экстракта из *C. islandica* на активность ростовых процессов, геммогенез, коэффициент размножения и ризогенез модельных объектов – *P. tremula* и *L. caerulea*. Экспериментальные результаты влияния изучаемого экстракта на морфогенез модельных объектов представлены на рис. 4.

На основе полученных данных можно заключить, что для *P. tremula* экстракт из *C. islandica* в концентрации 10 мг/л не имеет достоверного влияния на удлинение побегов. Увеличение концентрации до 50 мг/л оказывает незначительное, но достоверное положительное действие на данный параметр роста. Однако дальнейшее увеличение концентрации экстракта до 500 мг/л ведет к ингибированию ростовых процессов *P. tremula*. Для культивируемых эксплантов *L. caerulea* внесение в питательную среду экстракта из лишайника *C. islandica* оказывало достоверное влияние на увеличение длины побегов в сравнении с контролем. Однако изменение длины эксплантов при концентрациях 10 мг/л и 50 мг/л экстракта не

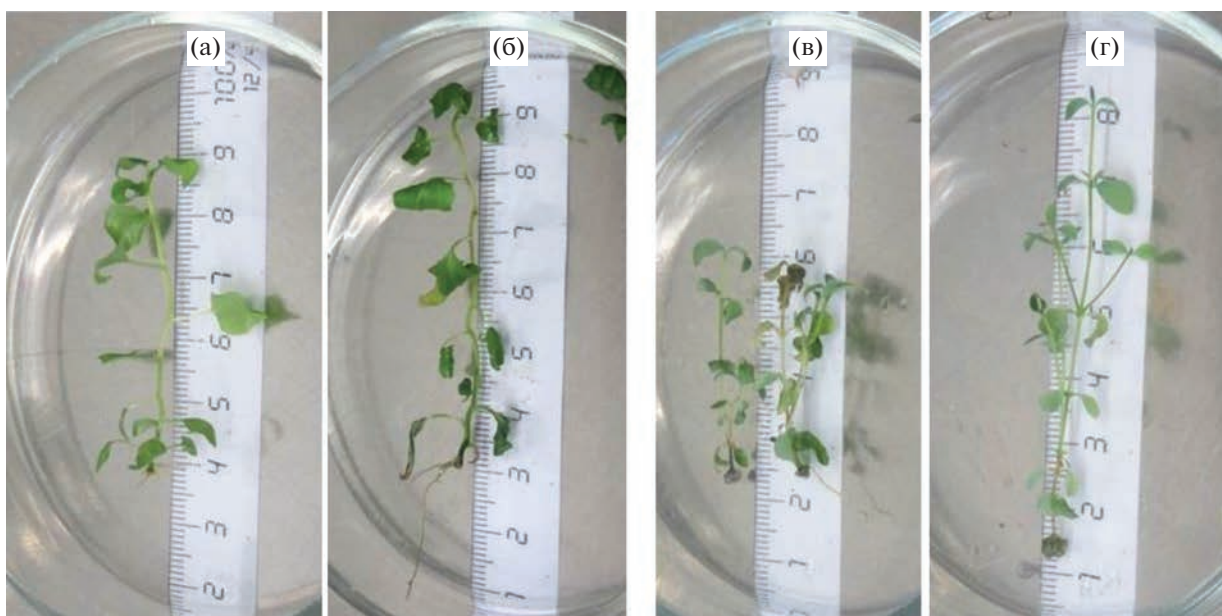


Рис. 5. Рост микропобегов на питательной среде с добавлением экстракта эпигейных лишенизированных грибов в концентрации 50 мг/л (справа) и на контрольной среде (слева) на 35 сут. культивирования: а – *P. tremula*, б – *L. caerulea*.

различались. Внесение в среду культивирования 500 мг/л экстракта для *L. caerulea* так же, как и для *P. tremula* приводило к замедлению роста в длину эксплантов. Характерным для обеих культур являлось увеличение длины микропобега на питательной среде с добавлением экстракта *C. islandica* по сравнению с контролем (на 5 и 7% при концентрациях 10 и 50 мг/л у *P. tremula* соответственно; на 12 и 13% при концентрациях 10 и 50 мг/л у *L. caerulea* соответственно). Данный эффект соответствует действию гиббереллинов [24]. При этом наблюдается различие роста структур, приводящих к увеличению длины микропобега: в случае *P. tremula* увеличение длины ассоциировано с образованием большего количества узлов на побеге (на 18 и 6% при концентрациях 50 и 500 мг/л), в случае же *L. caerulea* увеличение длины побега происходит большей частью за счет роста междоузлий, так как увеличения количества узлов на побеге по сравнению с контролем не наблюдается (рис. 5).

Внесение в питательную среду 10 мг/л экстракта лишайника оказывало незначительное негативное влияние на формирование почек эксплантами *P. tremula* в сравнении с контролем (рис. 4б).

Увеличение же концентрации до 50 мг/л приводило к достоверному увеличению геммогенеза. Как и для удлинения побегов концентрация в 500 мг/л экстракта в среде культивирования тормозила процессы формирования эксплантами *P. tremula* новых почек. Для *L. caerulea* концентрации экстракта 10 мг/л и 500 мг/л не имели достоверного различия по оказываемому действию на

геммогенез с контролем. Наиболее эффективное действие при этом оказывала концентрация в 50 мг/л, при которой наблюдали формирование 5.9 ± 0.2 новых почек.

Одним из показателей, характеризующим эффективность клонального микроразмножения, на который мы обращали внимание, являлся коэффициент размножения. Некоторыми авторами принимается за коэффициент размножения при микроразмножении растений количество почек, сформированных побегом в процессе культивирования, однако зачастую “стандартных” эксплантов, пригодных для последующего использования оказывается несколько меньше. Добавление в среду для культивирования модельных растительных объектов экстракта из *C. islandica* не оказывало существенного влияния на коэффициент размножения *P. tremula* (наибольшее значение коэффициента размножения для *P. tremula* наблюдали при концентрации экстракта в среде 50 мг/л – 3.01, по сравнению с контролем – 2.80), значимого различия не наблюдали даже для концентрации экстракта 500 мг/л (рис. 4в). В то же время коэффициент размножения *L. caerulea* при внесении в среду экстракта из лишайника во всех исследуемых концентрациях имел достоверное различие с контролем и оказывал положительное действие.

Добавление экстракта лишайника позволило в разной степени увеличить коэффициент размножения обеих культур: на 8% при концентрации 50 мг/л в случае *P. tremula* и на 29 и 31% в случае *L. caerulea* при концентрациях 30 и 50 мг/л соот-

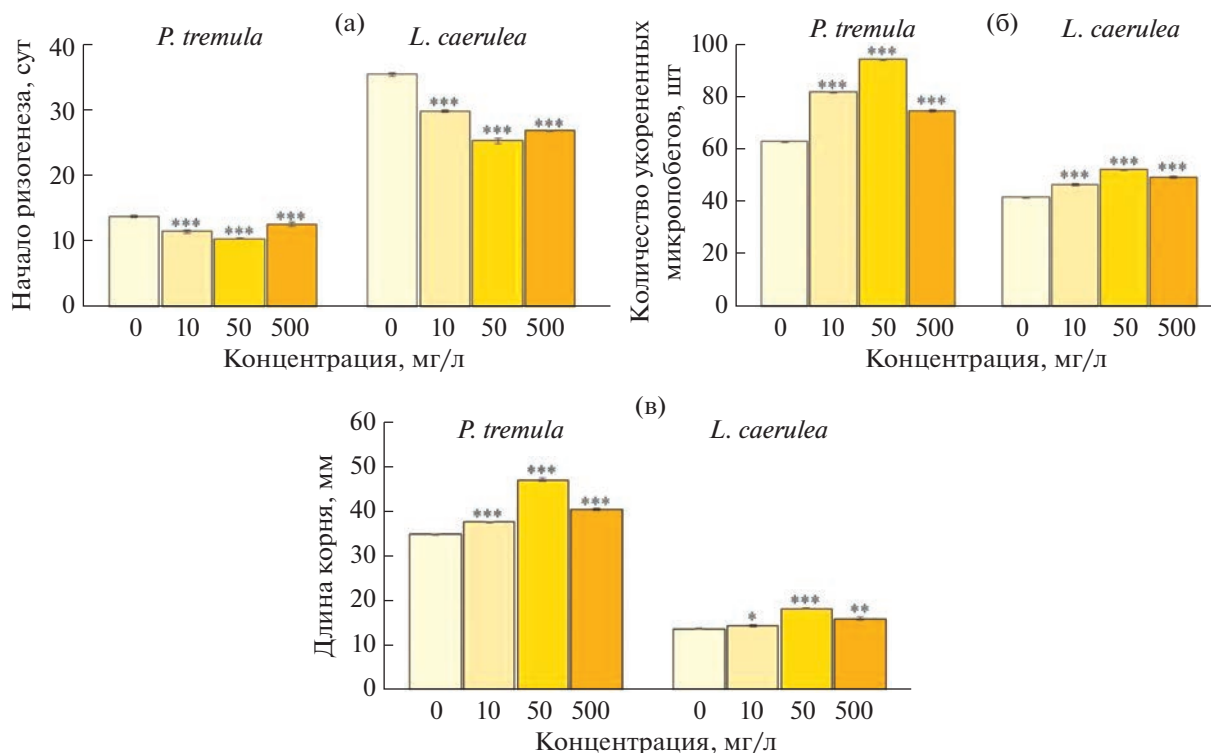


Рис. 6. Влияние экстракта из лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach на ризогенез микропобегов 1 — *P. tremula* и 2 — *L. caerulea* в культуре *in vitro* на: а) начало ризогенеза; б) количество укорененных микропобегов; в) длину корня. * — при $P < 0.05$; ** — при $P < 0.01$; *** — при $P < 0.001$.

ветственно. Полученные результаты позволяют предположить, что данный эффект обусловлен увеличением количества узлов и длины междоузлий, что позволяет разделить микропобег на большее количество метамеров при клональном микроразмножении в случае их близкого расположения.

Таким образом, при добавлении в состав питательной среды экстракта лишайника в концентрации до 50 мг/л мы наблюдали увеличение коэффициента размножения обеих культур, а также увеличение длины микропобега (за счет роста междоузлий у *L. caerulea* и образования большего количества узлов у *P. tremula*).

Витрификация — негативное явление в культуре ткани растений, обусловленное обводненностью тканей экспланта, приводящее чаще всего к их гибели и уменьшению коэффициента размножения. Экстракт из *C. islandica* в отношении эксплантов *P. tremula* увеличивал выход витрифицированных побегов во всех исследуемых концентрациях (рис. 4г).

Положительное действие экстракта на витрификацию побегов было отмечено в отношении эксплантов *L. caerulea*. Так 50 мг/л экстракта из *C. islandica* в среде культивирования демонстрировало снижение количества витрифицированных побегов на 10–15% по сравнению с контро-

лем. Меньшая доза внесения экстракта (10 мг/л) не оказывала существенного влияния на витрификацию эксплантов *L. caerulea*, в то же время увеличение концентрации экстракта до 500 мг/л приводило к увеличению данного показателя для эксплантов. Отсутствие выраженного негативного влияния наблюдается в случае *L. caerulea*: при концентрациях экстракта 10 и 50 мг/л процент витрифицированных и этиолированных микропобегов (желтоватой окраски, с сильно вытянутым стеблем, слабым развитием листьев) не превышал контроль (10, 9 и 11% соответственно).

До настоящего момента не было изучено влияние вторичных метаболитов в составе экстракта лихенизированных грибов на активность ризогенеза высших растений, в соответствии с чем, мы видим необходимость проведения данного исследования (рис. 6).

Было отмечено положительное влияние экстракта из талломов *C. islandica* в концентрациях от 10 до 500 мг/л на ризогенез *P. tremula* и *L. caerulea* (рис. 6а). Так, время образования корней на эксплантах *P. tremula* сокращалось при концентрации 10 мг/л экстракта в среде культивирования с 14 до 11 сут. по сравнению с контролем, увеличение концентрации до 50 мг/л сокращало время ризогенеза до 10 сут. Наступление начала ризогенеза у *L. caerulea* происходит в более поздние сро-

ки, однако в целом тенденция, характерная для *P. tremula*, сохранялась: начало формирования и роста корней происходило в более ранние сроки при концентрации экстракта 10 мг/л (30 сут.) по сравнению с контролем (35 сут.), а при концентрации экстракта 50 мг/л — 25 сут. Таким образом, можно заключить, что вторичные метаболиты лишайника *C. islandica* в концентрации 10–50 мг/л среды оказывают стимулирующее воздействие на ризогенез культур *P. tremula* и *L. caerulea* в условиях *in vitro*.

В ходе исследования было отмечено положительное влияние вторичных метаболитов *C. islandica* на количество укорененных микропобегов как для *L. caerulea*, так и *P. tremula*. Добавление в питательную среду экстракта в концентрации 10 мг/л повышало процент укорененных микропобегов *P. tremula* на 19%, а при 50 мг/л — на 31% по сравнению с контролем. Дальнейшее повышение концентрации экстракта в среде снижало количество укорененных побегов *P. tremula* (рис. 6б).

В случае *L. caerulea* отмечали меньший процент укоренения, но при этом сохраняется тенденция к увеличению числа укорененных побегов на среде с концентрацией экстракта от 10 до 50 мг/л на 5–10% соответственно по сравнению с контролем.

Аналогичную ситуацию наблюдали в отношении средней длины корня: при увеличении концентрации до 50 мг/л происходило увеличение средней длины корня как для *L. caerulea*, так и *P. tremula* в сравнении с контролем. Дальнейшее повышение концентрации снижало данный эффект (рис. 6в).

Резюмируя выше обозначенное, можно заключить, что экстракт из лишенизированных грибов *C. islandica* в концентрации 10–50 мг/л обладает действием на *P. tremula* и *L. caerulea*, подобным активности стриголактонов и гибберелинов при культивировании их в условиях *in vitro*, стимулируя более раннее начало ризогенеза микропобегов, а также непосредственно рост корней. Кроме того, на средах с добавлением 10–50 мг/л экстракта лишайников наблюдается больший рост междоузлий микропобегов, что свидетельствует об эффекте, индуцирующем растяжение клеток и процесс корнеобразования. В соответствии с полученными данными определена оптимальная концентрация в 50 мг/л ацетонового экстракта из *C. islandica*, приводящая к увеличению коэффициента размножения *P. tremula* и *L. caerulea* и повышению процента укоренения микропобегов при минимальной их витрификации.

Ввиду наличия в талломах *C. islandica* вторичных метаболитов, спектр применения которых достаточно широк, имеется необходимость изучения перспективы получения данных соединений при культивировании как компонентов ли-

хенизированных грибов, так и их ассоциаций, в условиях *in vitro* [28].

Таким образом, экспериментально подтверждена гипотеза, сформулированная на основе *in silico* анализа о гибберелиноподобном и стриголактонподобном воздействии некоторых веществ из *C. islandica* на примере культуры *in vitro* *P. tremula* и *L. caerulea*.

Работа выполнена с использованием ресурсов ЦКП “Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей” Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-674).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pawar G., Madden J.C., Ebbrell D., James W.F., Cronin M.T.D. *In silico* toxicology data resources to support read-across and (Q)SAR // Front Pharmacol. 2019. V. 10. P. 561. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00561>
2. Calcott M.J., Ackerley D.F., Knight A., Keyzers R.A., Owen J.G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis // Chem. Soc. Rev. 2018. V. 47. P. 1730. <https://doi.org/10.1039/C7CS00431A>
3. Asplund J., Wardle D.A. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 2017. V. 92. P. 1720. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/brv.12305>
4. Урбанавичюс Г.П. Список лишенофлоры России. СПб.: Наука, 2010. С. 194 с.
5. Xu M., Heidmarsson S., Thorsteinsdottir M., Kreuzer M., Hawkins J., Omarsdottir S., Olafsdottir E.S. Authentication of iceland moss (*Cetraria islandica*) by UPLC-QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding // Food Chem. 2018. V. 245. P. 989. Available. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.073>
6. Ogmundsdottir H.M., Zoëga G.M., Gissurarson S.R., Ingólfssdottir K. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes // J. Pharm. Pharmacol. 1998. V. 50. P. 107. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03312.x>
7. Bucar F., Schneider I., Ögmundsdottir H., Ingólfssdottir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets // Phytomed. 2004. V. 11. P. 602. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.03.004>
8. Freysdottir J., Omarsdottir S., Ingólfssdottir K., Víkingsson A., Olafsdottir E.S. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica* // Int. Immuno-

- pharm. 2008. V. 8. P. 423.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.11.007>
9. *Luzina O.A., Salakhutdinov N.F.* Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part2. effects on higher organisms // *Mol. Physicochem. Aspects. Russ. J. Bio-org. Chem.* 2016. V. 42. P. 249.
<https://doi.org/10.1134/S1068162016030109>
 10. *Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O., Rossiello F.* Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems // *Cell. Mol. Life Sci.* 1997. V. 53. P. 667.
<https://doi.org/10.1007/s000180050086>
 11. *Latkowska E., Lechowski Z., Bialczyk J., Pilarski J.* Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (+)-Usnic Acid // *J. Chem. Ecol.* 2006. V. 32. P. 2053.
<https://doi.org/10.1007/s10886-006-9128-6>
 12. *Lechowski Z., Latkowska E., Bialczyk J.* Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid // *Environ. Exp. Bot.* 2006. V. 56. P. 239.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.03.001>
 13. *Inoue H., Noguchi M., Kubo K.* Site of inhibition of usnic acid at oxidizing side of photosystem 2 of spinach chloroplasts // *Photosynth.* 1987. V. 21. P. 88.
 14. *Lascève G., Gauguier F.* Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets // *J. Plant Physiol.* 1990. V. 136. P. 723.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81352-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81352-0)
 15. *Orús M., Estévez M., Vicente C.* Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus roundifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states // *Physiol. Plant.* 2006. V. 52. P. 263.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb08503.x>
 16. *Follmann G.* Flechtenstoffe und stecklingsbewurzelung // *Die Naturwissenschaften.* 1965. V. 52. P. 266.
<https://doi.org/10.1007/BF00602940>
 17. *Sander T., Freyss J., von Korff M., Rufener C.* Data warrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis // *J. Chem. Inf. Model.* 2015. V. 55. P. 460.
<https://doi.org/10.1021/ci500588j>
 18. *Goga M., Antreich S., Backor M., Weckwerth W., Lang I.* Lichen secondary metabolites affect growth of *Physcomitrella patens* by allelopathy // *Protoplasma.* 2017. V. 254. P. 1307.
<https://doi.org/10.1007/s00709-016-1022-7>
 19. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 20. *Ingolfsson K., Breu W., Huneck S., Gudjonsdottir G.A., Müller-Jakic B., Wagner H.* In vitro inhibition of 5-lipoxygenase by protolichetonic acid from *Cetraria islandica* // *Phytomed.* 1994. V. 1. P. 187.
[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80063-2](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80063-2)
 21. *Mishra S., Upadhyay S., Shukla R.K.* The role of strigolactones and their potential cross-talk under hostile ecological conditions in plants // *Front. Plant Physiol.* 2017. V. 7. P. 691.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00691>
 22. *Mitra D., Rad K.V., Chaudhary P., Ruparelia J., Sagari M.S., Boutaj H., Mohapatra P.K., Das P.P.* Involvement of strigolactone hormone in root development, influence and interaction with mycorrhizal fungi in plant: Mini-review // *Curr. Res. Microb. Sci.* 2021. V. 2. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100026>
 23. *Rehman N.U., Li X., Zeng P., Guo S., Jan S., Liu Y., Huang Y., Xie Q.* Harmony but not uniformity: role of strigolactone in plants // *Biomolec.* 2021. V. 11. P. 1616.
<https://doi.org/10.3390/biom11111616>
 24. *Rizza A., Jones A.M.* The makings of a gradient: spatio-temporal distribution of gibberellins in plant development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019. V. 47. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.08.001>
 25. *Pouvreau J.-B., Gaudin Z., Auger B., Lechat M.-M., Gauthier M., Delavault P., Simier P.* A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants // *Plant Meth.* 2013. V. 9. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-32>
 26. *Rasmussen A., Depuydt S., Goormachtig S., Geelen D.* Strigolactones fine-tune the root system // *Planta.* 2013. V. 238. P. 615.
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-1911-3>
 27. *Cornea-Cipcigan M., Pamfil D., Sisea C.R., Mărgăoan R.* Gibberellic acid can improve seed germination and ornamental quality of selected cyclamen species grown under short and long days // *Agron.* 2020. V. 10. P. 516.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10040516>
 28. *Behera B., Verma N., Sonone A., Makhija U.* Experimental studies on the growth and usnic acid production in "lichen" *Usnea ghattensis* in vitro // *Microbiol. Res.* 2006. V. 161. P. 232.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.006>